

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

SALLY KATIUCE MOCCELINI

**SENSORES MODIFICADOS COM MONOCAMADAS AUTO-
ORGANIZADAS DE TIÓIS PARA DETERMINAÇÃO DE
DOPAMINA, TIODICARBE E CATEQUINA**

Florianópolis – SC

2011

SALLY KATIUCE MOCCELINI

**SENSORES MODIFICADOS COM MONOCAMADAS AUTO-
ORGANIZADAS DE TIÓIS PARA DETERMINAÇÃO DE
DOPAMINA, TIODICARBE E CATEQUINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Iolanda Cruz Vieira

Florianópolis – SC

Fevereiro de 2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

M687s Moccelini, Sally Katiuce

Sensores modificados com monocamadas auto-organizadas de tióis para determinação de dopamina, tiodicarbo e catequina [tese] / Sally Katiuce Moccelini ; orientadora, Iolanda da Cruz Vieira. - Florianópolis, SC, 2011.

138 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Sensores. 3. Monocamadas. 4. Tióis.
I. Vieira, Iolanda da Cruz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

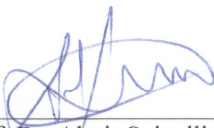
CDU 54

SALLY KATIUCE MOCCELINI

SENSORES MODIFICADOS COM MONOCAMADAS AUTO-
ORGANIZADAS DE TIÓIS PARA DETERMINAÇÃO DE
DOPAMINA, TIODICARBE E CATEQUINA

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Doutor em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2011.

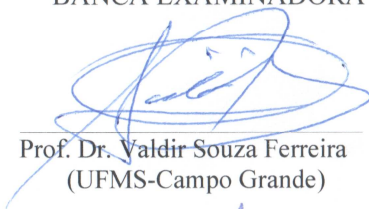


Prof. Dr. Almir Spinelli
Coordenador do Programa



Prof.ª Dr.ª Iolanda da Cruz Vieira
Orientadora

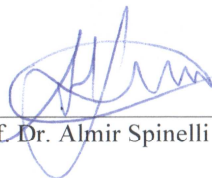
BANCA EXAMINADORA



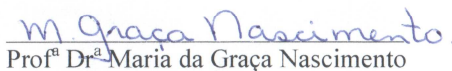
Prof. Dr. Valdir Souza Ferreira
(UFMS-Campo Grande)



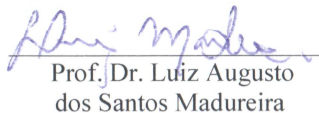
Prof.ª Dr.ª Maria Del Pilar Taboada
Sotomayor (UNESP-Araraquara)



Prof. Dr. Almir Spinelli



Prof.ª Dr.ª Maria da Graça Nascimento



Prof. Dr. Luiz Augusto
dos Santos Madureira

*Invisible life that sustains all,
I awaken to life everything
In every waft of air.
The air is life,
Greening and blossoming.
The waters flow with life.
The sun is lit with life.
The moon, when waning, is again
rekindled by the sun,
waxing with life once more.
The stars shine,
Radianting with life-light.
All creation is gifted with the
Ecstasy of God's light.*



Hildegard Von Benden

A Deus por todo Seu amor

*Dedico esta tese
aos meus pais João Carlos e Helenita,
ao meu irmão Jhon e ao meu esposo Antonio
pelo amor, dedicação e apoio em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço pela vida, bênçãos, graças e providência, por mostrar-se presente nos momentos mais difíceis.

À Prof^a Dr^a Iolanda Cruz Vieira por sua dedicada orientação, paciência e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina e aos professores e funcionários do Departamento de Química que de alguma forma contribuíram para a minha formação, especialmente à Prof^a Maria da Graça Nascimento e aos Profs. Dr. Almir Spinelli, Dr. Hernán Francisco Terenzi, Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira e Dr. Valfredo Tadeu de Fávère.

Ao Prof. Dr. Ademir Neves pela doação do complexo de níquel e contribuições. Ao Tiago Pacheco de Camargo pela síntese e caracterização do complexo de níquel.

Ao Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke pelo método comparativo de eletroforese capilar.

Ao Bruno G. Lucca e Antônio M. J. Barbosa pelas análises cromatográficas.

Aos colegas Ana Cristina, Daniela, Eduardo Schiling, Eduardo Zapp, Franciele, Giselle, Inês, Kamilla, Mirella, Murilo e Suellen do Laboratório de Biossensores (LaBios), pela amizade, auxílio, contribuições e alegre companhia.

À Andressa Galli e Juliana Cancino pelas valiosas sugestões e disponibilidade.

Aos professores da banca, por aceitarem fazer parte da mesma.

À maestrina Miriam Moritz e aos demais colegas do Coral da UFSC que proporcionaram momentos maravilhosos de amizade e musicalidade.

Aos Amigos e Amigas que tive o grande prazer de conhecer em Florianópolis, os quais vou guardar sempre em meu coração.

Ao Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago pela doação dos produtos farmacêuticos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Pesquisa (CNPq) pelo suporte financeiro.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORAMENTO

Trabalhos publicados em revistas científicas:

FRANZOI, A.C.; BRONDANI, D., ZAPP, E.; MOCCELINI, S.K.; FERNANDES, S.C.; VIEIRA, I.C.; DUPONT, J. Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos. **Quim. Nova**, 2011 (Aceito para publicação).

MOCCELINI, S.K.; FRANZOI, A.C.; VIEIRA, I.C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C.W. A novel support for laccase immobilization: Cellulose acetate modified with ionic liquid and application in biosensor for methyl dopa detection. **Biosens. Bioelectron.**, 2011 (in press).

MOCCELINI, S.K.; VIEIRA, I.C.; LIMA, F.; LUCCA, B.G.; BARBOSA, A.M.J.; FERREIRA, V.S., Determination of thiodicarb using a biosensor based on alfalfa sprout peroxidase immobilized in self-assembled monolayers. **Talanta**, 82, 164-170, 2010.

LIMA, F.; LUCCA, B.G.; BARBOSA, A.M.J.; FERREIRA, V.S.; MOCCELINI, S.K.; FRANZOI, A.C.; VIEIRA, I.C., Biosensor based on pequi polyphenol oxidase immobilized on chitosan crosslinked with cyanuric chloride for thiodicarb determination. **Enzyme Microb Technol**, 47, 153-158, 2010.

MOCCELINI, S.K.; FERNANDES, S.C.; CAMARGO, T.P.; NEVES, A.; VIEIRA, I.C., Self-assembled monolayer of nickel (II) complex and thiol on gold electrode for the determination of catechin. **Talanta**, 78, 1063-1068, 2009.

FERNANDES, S.C.; MOCCELINI, S.K.; SCHEEREN, C.W.; MIGOWSKI, P.; DUPONT, J.; HELLER, M.; MICKE, G.A.; VIEIRA, I.C., Biosensor for chlorogenic acid based on an ionic liquid containing iridium nanoparticles and polyphenol oxidase. **Talanta**, 79, 222-228, 2009.

MOCCELINI, S.K.; FERNANDES, S.C.; VIEIRA, I.C., Bean sprout peroxidase biosensor based on L-cysteine self-assembled monolayer for the determination of dopamine. **Sens Actuators B**, 133, 364-369, 2008.

MOCCELINI, S.K.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I.C., Biosensors based on bean sprout homogenate immobilized in chitosan microspheres and silica for determination of chlorogenic acid. **Enzyme Microb Technol**, 43, 381-387, 2008.

Trabalhos apresentados em congressos:

LIMA, F.; LUCCA, B.G.; BARBOSA, A.M.J.; FERREIRA, V.S.; MOCCELINI, S.K.; FRANZOI, A.C.; VIEIRA, I.C., Biosensor baseado em polifenol oxidase imobilizada em quitosana reticulada com cloreto cianúrico. **XVIII Encontro de Química da Região Sul**, Curitiba, 2010.

MOCCELINI, S.K.; FERNANDES, S.C.; PACHECO, T.C.; NEVES, A.; VIEIRA, I.C., Sensor contendo complexo de níquel imobilizado em camada auto-organizada; **XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, Fortaleza, 2009.

MOCCELINI, S.K.; FERNANDES, S.C.; MICKE, G.A., MIGOWSKI, P.; DUPONT, J.; VIEIRA, I.C., Líquido iônico com nanopartículas de irídio na construção de biossensor. **XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, Fortaleza, 2009.

MOCCELINI, S.K.; FERNANDES, S.C.; VIEIRA, I.C., Biossensor contendo monocamadas auto-organizadas de L-cisteína e peroxidase de broto de feijão para determinação de dopamina. **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia, 2008.

MOCCELINI, S.K.; FERNANDES, S.C.; VIEIRA, I.C., Camada auto-organizada: uma alternativa versátil para a construção de sensores. **XVI Encontro de Química da Região Sul**, Blumenau, 2008.

FERNANDES, S.C.; MOCCELINI, S.K.; VIEIRA, I.C., Biossensor para ácido cafeico usando líquido iônico e polifenol oxidase. **XVI Encontro de Química da Região Sul**, Blumenau, 2008.

MOCCELINI, S.K.; VIEIRA, I.C.; SPINELLI, A., Construção e aplicação de biossensores contendo peroxidase de broto de feijão (*Vigna radiata*). **14º Encontro de Química Analítica**, João Pessoa, 2007.

RESUMO

Esta tese descreve a construção de sensores a partir da modificação da superfície de eletrodos de ouro com monocamadas auto-organizadas (SAM) de tióis, enzima peroxidase e complexo de níquel (II). Após a otimização, os sensores foram usados para determinação de dopamina em fármacos, tiodicarbe em frutas e legumes e catequina em chá verde.

Foi construído um biossensor para dopamina a partir da modificação de um eletrodo de ouro com SAM de L-cisteína, sobre a qual foi imobilizada peroxidase obtida de brotos de feijão (*Vigna radiata*). O biossensor apresentou resposta linear para dopamina de $9,91 \times 10^{-6}$ a $2,21 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $4,78 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e limite de quantificação de $1,60 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Apresentou tempo de vida útil de 15 dias. Os resultados obtidos na determinação de dopamina em fármacos com este sensor estão de acordo com aqueles obtidos com o método espectrofotométrico em um nível de 95% de confiança.

Um segundo biossensor construído a base de SAM de L-cisteína e peroxidase de broto de alfafa (*Medicago sativa*) foi empregado para determinação de tiodicarbe em amostras de batatas, maçãs e morangos. Usando este sensor, a curva analítica foi linear para tiodicarbe nas concentrações entre $2,27 \times 10^{-6}$ e $4,40 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $5,75 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e um limite de quantificação de $1,92 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. O tempo de vida deste eletrodo foi de 20 dias. Os resultados do método proposto estão de acordo em um nível de 95% de confiança com os resultados do procedimento de cromatografia líquida de alta eficiência.

Foi também desenvolvido um sensor para determinação de catequina em chá verde, no qual um complexo de níquel (II) foi imobilizado sobre SAM de ácido 3-mercaptopropiônico na superfície do eletrodo de ouro. Este eletrodo modificado apresentou uma resposta linear para catequina no intervalo de $3,31 \times 10^{-6}$ a $2,53 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $8,26 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e limite de quantificação de $2,75 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. O tempo de vida deste eletrodo foi investigado durante quatro semanas e os resultados demonstram uma perda aparente de sua resposta após 20 dias. A determinação de catequina em chá verde utilizando o sensor proposto está de acordo com o método de eletroforese capilar em um nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: sensores, monocamadas auto-organizadas, tióis.

ABSTRACT

This thesis describes the construction of sensors from the surface modification of gold electrodes with self-assembled monolayers (SAM) of thiols, peroxidase enzyme and complex of nickel(II). After optimization, the sensors were used for determination of dopamine in pharmaceuticals, thiodicarb in fruits and vegetables and catechin in green tea.

A biosensor for dopamine was built through the modification of a gold electrode with SAM of L-cysteine, on which was immobilized peroxidase from bean sprouts (*Vigna radiata*). This biosensor showed linear response to dopamine of 9.91×10^{-6} to 2.21×10^{-4} mol L⁻¹ with a detection limit of 4.78×10^{-7} mol L⁻¹ and limit of quantification of 1.60×10^{-6} mol. It presented useful lifetime of 15 days. The results for the determination of dopamine in pharmaceutical formulations with this modified electrode are in agreement with those obtained with the spectrophotometric method in a 95% level of confidence.

A second SAM-based biosensor for L-cysteine and peroxidase from alfalfa sprouts (*Medicago sativa*) was constructed to determine thiodicarb in samples of potatoes, apples and strawberries. Using this sensor, calibration curve was linear for thiodicarb concentrations between 2.27×10^{-6} and 4.40×10^{-5} mol L⁻¹ with a detection limit of 5.75×10^{-7} mol L⁻¹ and a limit of quantification of 1.92×10^{-6} mol L⁻¹. The lifetime of this electrode was 20 days. The results of the proposed method are in agreement on a 95% level of confidence with the results of high performance liquid chromatography

It was also constructed a sensor for determination of catechin in green tea, in which a complex of nickel (II) was immobilized on SAM of 3-mercaptopropionic acid on the surface of gold electrode. This modified electrode showed a linear response to catechin in the range of 3.31×10^{-6} to 2.53×10^{-5} mol L⁻¹ with a detection limit of 8.26×10^{-7} mol L⁻¹ and limit of quantification of 2.75×10^{-6} mol L⁻¹. The lifetime of this electrode was investigated for four weeks and the results show an apparent loss of response after 20 days. Determination of catechin in green tea using the proposed sensor is in accordance with the method of capillary electrophoresis in a confidence level of 95%.

Keywords: Sensors, self-assembled monolayers, thiols.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da inclinação da cadeia alquílica de uma molécula de alcanotíol auto-organizada sobre uma superfície de ouro (FERRETI <i>et al.</i> , 2000).....	33
Figura 2. Monocamadas auto-organizadas sobre a superfície de ouro.....	34
Figura 3. Alcanotióis com grupos terminais $-NH_2$ e $-COOH$	34
Figura 4. Componentes de um biossensor típico (GRIESHABER <i>et al.</i> , 2008).....	38
Figura 5. Célula eletroquímica contendo um biossensor, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar.	39
Figura 6. Ligação peptídica.	41
Figura 7. Representação comparativa da energia de ativação de uma reação não enzimática e uma reação enzimática.	41
Figura 8. Biossensor contendo peroxidase para análise de um difenol.....	44
Figura 9. Protoporfirina, sítio ativo de muitas peroxidases.....	45
Figura 10. Ciclo catalítico da peroxidase (VEITCH, 2004).....	45
Figura 11. Métodos de imobilização de enzimas.....	47
Figura 12. Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada.....	50
Figura 13. Voltamogramas de onda quadrada (1) processo redox de um sistema reversível e (2) processo redox de um sistema irreversível (SOUZA <i>et al.</i> , 2003).....	50
Figura 14. Estrutura da dopamina.....	54
Figura 15. Reação entre guaiacol e peróxido de hidrogênio, catalisada pela peroxidase.....	61
Figura 16. Determinação da atividade da peroxidase.	61
Figura 17. Representação esquemática da formação do biossensor Au-SAM-broto de feijão.....	64
Figura 18. Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de $9,74 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} dopamina e $6,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato ($0,1$ mol L^{-1} , pH 7,0) para (a) eletrodo de ouro e (b) eletrodo Au-SAM-broto de feijão.	65
Figura 19. Representação esquemática da oxidação/redução da dopamina.....	66
Figura 20. Influência do pH sobre a resposta do biossensor.....	67
Figura 21. Influência da concentração de peróxido de hidrogênio.	67
Figura 22. Estudo da frequência sobre a resposta analítica do biossensor.....	68
Figura 23. Estudo da amplitude de pulso sobre a resposta analítica do biossensor.	69
Figura 24. Estudo do incremento sobre a resposta analítica do biossensor.....	69
Figura 25. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o eletrodo Au-SAM-broto de feijão em solução tampão fosfato ($0,1$ mol L^{-1} , pH 6,0) para (a) peróxido de hidrogênio $6,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} e soluções de dopamina nas concentrações: (b) $9,91 \times 10^{-6}$; (c) $1,65 \times 10^{-5}$; (d) $3,29 \times 10^{-5}$; (e) $6,53 \times 10^{-5}$; (f) $9,74 \times 10^{-5}$; (g) $1,30 \times 10^{-4}$; (h) $1,60 \times 10^{-4}$; (i) $1,91 \times 10^{-4}$; (j) $2,21 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} ; em	

amplitude de pulso de 80 mV; frequência de 100 Hz e incremento de 4 mV. (B)	
Curva analítica da dopamina.....	71
Figura 26. Fórmula estrutural do tiodicarbe.	78
Figura 27. Estudo de pH sobre a resposta do biossensor.	83
Figura 28. Estudo da concentração da enzima no biossensor.	84
Figura 29. Estudo da frequência sobre a resposta analítica do biossensor.	85
Figura 30. Estudo da amplitude de pulso sobre a resposta analítica do biossensor.	86
Figura 31. Estudo do incremento sobre a resposta analítica do biossensor.....	86
Figura 32. Representação esquemática da reação envolvendo hidroquinona sobre a superfície do biossensor e a reação entre peroxidase e tiodicarbe. (a) hidroquinona, (b) <i>p</i> -benzoquinona, (c) tiodicarbe e (d) composto sulfóxido.	88
Figura 33. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor em (a) solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0), (b) hidroquinona 1,96×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ e adições de tiodicarbe (c) 2,26×10 ⁻⁶ , (d) 4,45×10 ⁻⁶ , (e) 8,58×10 ⁻⁶ , (f) 1,24×10 ⁻⁵ , (g) 1,60×10 ⁻⁵ , (h) 1,93×10 ⁻⁵ , (i) 2,24×10 ⁻⁵ , (j) 2,54×10 ⁻⁵ , (k) 2,81×10 ⁻⁵ , (l) 3,08×10 ⁻⁵ , (m) 3,32×10 ⁻⁵ , (n) 3,55×10 ⁻⁵ , (o) 3,88×10 ⁻⁵ e (p) 4,37×10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ . (B) Curva analítica correspondente ao tiodicarbe.	90
Figura 34. Complexo Níquel II(L).....	97
Figura 35. Estrutura da catequina.	98
Figura 36. Resposta do sensor para os compostos fenólicos investigados.	101
Figura 37. Representação esquemática da imobilização do complexo de níquel (II) sobre o eletrodo Au-SAM.	102
Figura 38. Oxidação/redução da catequina sobre a superfície do sensor.	103
Figura 39. Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de catequina 2,83×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 7,0) para (a) eletrodo de ouro e (b) eletrodo Au-SAM-complexo de Ni(II).	104
Figura 40. Estudo de pH sobre a resposta do sensor.	105
Figura 41. Estudo de frequência sobre a resposta analítica do sensor.	106
Figura 42. Estudo da amplitude sobre a resposta analítica do sensor.	106
Figura 43. Estudo do incremento sobre a resposta analítica do sensor.	107
Figura 44. Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o eletrodo Au-SAM-complexo de Ni(II) para: (a) solução tampão fosfato e soluções de catequina nas seguintes concentrações: (b) 3,31×10 ⁻⁶ ; (c) 6,58×10 ⁻⁶ ; (d) 9,80×10 ⁻⁶ ; (e) 1,30×10 ⁻⁵ ; (f) 1,61×10 ⁻⁵ ; (g) 1,92×10 ⁻⁵ ; (h) 2,23×10 ⁻⁵ ; (i) 2,53×10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em amplitude de pulso de 60 mV, frequência 80 Hz e incremento 10 mV.	108
Figura 45. Curva analítica para catequina.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Otimização da construção do eletrodo Au-SAM-broto de feijão	63
Tabela 2. Resultados para recuperação da solução padrão de dopamina em formulações farmacêuticas usando o biossensor.....	72
Tabela 3. Determinação de dopamina em fármacos usando o método espectrofotométrico e o biossensor.....	73
Tabela 4. Sensores para a determinação de dopamina	74
Tabela 5. Resposta relativa do biossensor para os compostos fenólicos investigados	82
Tabela 6. Resposta relativa do biossensor para os compostos fenólicos investigados	89
Tabela 7. Biossensores contendo oxidoredutases para determinação de analitos pelo processo de inibição.....	91
Tabela 8. Recuperação do tiodicarbe em extratos de batata, maçã e morango usando o método proposto	92
Tabela 9. Determinação de tiodicarbe (mg L^{-1}) em amostras de extratos de batata, maçã e morango usando o método oficial e o biossensor proposto	93
Tabela 10. – Determinação de catequina em chá verde usando o sensor proposto e o método de eletroforese capilar	109

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
AMP	Ácido 3-mercaptopropiônico
Au-SAM-broto de feijão	Eletrodo de ouro modificado com SAM de L-cisteína e peroxidase de broto de feijão
Au-SAM-broto de alfafa	Eletrodo de ouro modificado com SAM de L-cisteína e peroxidase de broto de alfafa
Au-SAM-complexo de Ni(II)	Eletrodo de ouro modificado com SAM de AMP e complexo de níquel (II)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (inglês: <i>High performance liquid chromatography</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (inglês: <i>Desoxirribonucleic acid</i>)
EQM	Eletrodos quimicamente modificados
Er	Erro relativo
FET	Transistor de efeito de campo (inglês: <i>Field Effect Transistor</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (inglês: <i>Ribonucleic acid</i>)
SAM	Monocamadas auto-organizadas (inglês: <i>Self-Assembled Monolayers</i>)

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	29
CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	31
1.1 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS	31
1.2 MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS.....	32
1.3 BIOCENSORES	38
1.4 ENZIMAS.....	40
1.4.1 Peroxidase	43
1.5 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	46
1.6 MOLÉCULAS SINTÉTICAS FUNCIONAIS.....	47
1.7 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS	48
1.7.1 Voltametria de Onda Quadrada	49
1.8 OBJETIVOS.....	51
1.8.1 Objetivos Específicos	51
1.8.1.1 Biossensores contendo peroxidase imobilizada sobre SAM de L-cisteína	51
1.8.1.2 Sensor contendo complexo de níquel (II) imobilizado sobre SAM de ácido 3-mercaptopropiônico.....	51
CAPÍTULO 2 BIOCENSORES CONTENDO PEROXIDASE IMOBILIZADA EM MONOCAMADA AUTO-ORGANIZADA DE L-CISTEÍNA PARA DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA	53
2.1 RESUMO.....	53
2.2 INTRODUÇÃO.....	54
2.3 PARTE EXPERIMENTAL.....	55
2.3.1 Reagentes e Soluções	55
2.3.2 Instrumentação	57
2.3.3 Obtenção da Peroxidase de Vegetal	58
2.3.4 Determinação da Atividade Enzimática	58
2.3.5 Pré-tratamento da Superfície do Eletrodo de Ouro.....	58
2.3.6 Construção do Biossensor	59
2.3.7 Medidas Eletroquímicas	59
2.3.8 Método Comparativo para Determinação de Dopamina	60
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
2.4.1 Obtenção e Determinação da Atividade da Peroxidase	60
2.4.2 Otimização da Construção do Eletrodo Au-SAM-Broto de Feijão.....	62
2.4.3 Modificação da Superfície do Eletrodo de Ouro e Comportamento Eletroquímico da Dopamina.	63

2.4.4	Otimização dos Parâmetros Experimentais.	66
2.4.5	Repetibilidade, Reprodutibilidade e Estabilidade do Biossensor	70
2.4.6	Curva Analítica.....	70
2.4.7	Estudo de Recuperação e Determinação de Dopamina	72
CAPÍTULO 3 BIOSSENSOR CONTENDO PEROXIDASE IMOBILIZADA EM MONOCAMADA AUTO-ORGANIZADA DE L-CISTEÍNA PARA DETERMINAÇÃO DE TIODICARBE.....		
3.1	RESUMO.....	76
3.2	INTRODUÇÃO.....	77
3.3	PARTE EXPERIMENTAL.....	79
3.3.1	Reagentes e Soluções	79
3.3.2	Instrumentação	80
3.3.2.1	Medidas Voltamétricas	80
3.3.3	Preparação do Eletrodo Au-SAM-broto de Alfafa	80
3.3.4	Preparação das Amostras e Análise do Tiodicarbe.....	80
3.3.5	Método Comparativo.....	81
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
3.4.1	Estudo dos Compostos Fenólicos.....	81
3.4.2	Otimização dos parâmetros experimentais	83
3.4.3	Repetibilidade, Reprodutibilidade e Estabilidade do Biossensor	87
3.4.4	Curvas Analíticas da Hidroquinona e Tiodicarbe.....	87
3.4.5	Estudo de Recuperação e Determinação do Tiodicarbe	92
CAPÍTULO 4 SENSOR CONTENDO COMPLEXO DE NI(II) E MONOCAMADA AUTO-ORGANIZADA DE ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIONICO PARA DETERMINAÇÃO DE CATEQUINA.....		
4.1	RESUMO.....	95
4.2	INTRODUÇÃO.....	96
4.3	PARTE EXPERIMENTAL.....	98
4.3.1	Reagentes e Soluções	98
4.3.2	Instrumentação	99
4.3.3	Obtenção do Eletrodo Au-SAM-complexo de Ni(II)	99
4.3.4	Preparação das Amostras de Chá Verde e Medidas Voltamétricas.....	100
4.3.5	Método Comparativo.....	100
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
4.4.1	Estudo dos Compostos Fenólicos.....	101
4.4.2	Formação do Eletrodo Au-SAM-complexo de Ni(II) e Comportamento Eletroquímico da Catequina.....	101

4.4.3	Otimização dos Parâmetros Experimentais	104
4.4.4	Repetibilidade, Reprodutibilidade e Estabilidade do Sensor	107
4.4.5	Curva Analítica, Recuperação e Determinação de Catequina	108
CONCLUSÕES		111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		113

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de construir novos sensores a partir da utilização de sistemas auto-organizados visando contribuir com o desenvolvimento de novas metodologias para a determinação de dopamina em fármacos, tiodicarbe em frutas e legumes e catequina em chá verde.

Esta tese compõe-se de quatro capítulos, sendo o primeiro uma introdução sobre a modificação de eletrodos, monocamadas auto-organizadas, enzimas e imobilização, biossensores, moléculas funcionais sintéticas, técnicas eletroanalíticas e os objetivos do trabalho.

Nos três capítulos seguintes são descritos os métodos desenvolvidos para determinação de dopamina, tiodicarbe e catequina. Foram desenvolvidos dois biossensores com peroxidase de fonte vegetal e SAM de L-cisteína e um sensor que utilizou um complexo de níquel (II) com propriedades eletrocatalíticas e SAM de ácido 3-mercaptopropiônico. Por último, apresentam-se as conclusões dos trabalhos desenvolvidos e as referências bibliográficas.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

Eletrodos usados em análise eletroquímica apresentam grande versatilidade, fornecem limite de detecção baixo, uma ampla faixa de resposta linear e boa estabilidade entre outras vantagens. No entanto, esses eletrodos são propensos a sofrer interferências ou contaminações da sua superfície por produtos resultantes de reações associadas ao processo eletroquímico principal. A cinética de transferência de elétrons entre os analitos e os materiais dos eletrodos pode ser demasiadamente lenta, prejudicando a sensibilidade na detecção destes compostos. Além disso, no caso de sensores amperométricos, destaca-se também a importância da seletividade das determinações, pois quando amostras complexas são analisadas, podem existir espécies químicas eletroativas no potencial selecionado (SOUZA, 1997; FREIRE *et al.*, 2003; LOWINSOHN e BERTOTTI, 2006).

Na intenção de minimizar os problemas acima descritos, os eletrodos quimicamente modificados (EQM) fornecem superfícies eletródicas com características que podem contornar efetivamente muitos destes problemas e aumentar a aplicabilidade e eficiência dos eletrodos tradicionais (FREIRE *et al.*, 2003). Além disso, a modificação da superfície pode conduzir a elaboração de inúmeros dispositivos para aplicações em diversas áreas, tais como alimentícia e farmacêutica. Modificar um eletrodo consiste em atribuir e controlar novas propriedades físico-químicas a sua superfície inerte através do acoplamento de espécies químicas ativas (orgânicas ou inorgânicas) (SOUZA, 1997; NASCIMENTO e ANGNES, 1998). Portanto, os EQM representam um recurso rápido e versátil para a preparação de novos sensores eletroquímicos estáveis e seletivos.

A escolha do substrato que terá sua superfície modificada é outro aspecto relevante da modificação de eletrodos, pois, deve ser apropriado para o método de imobilização selecionado e ainda apresentar características eletroquímicas adequadas. Dentre os materiais utilizados como suporte está o ouro, platina, carbono vítreo, pasta de carbono, vidros e plásticos condutores. Os métodos mais comuns de modificação dos eletrodos são via adsorção, eletroadsorção, recobrimento com membranas poliméricas, formação de compósitos e reações químicas (PEREIRA *et al.*, 2002).

Uma técnica que vem sendo utilizada como alternativa na modificação de superfícies eletródicas é a formação de monocamadas

auto-organizadas (SAM – *Self-Assembled Monolayers*) (FERRETI *et al.*, 2000; CHAKI e VIJAYAMOHANAN, 2002). As SAM proporcionam um sistema flexível e simples que se adapta às propriedades de metais, óxidos metálicos e semicondutores (especialmente pela adsorção de alcanotióis sobre ouro) pelas quais é possível gerar superfícies bem definidas e com funcionalidades úteis e modificáveis na interface exposta. Desta forma, as SAM viabilizam interações com materiais biológicos ou não, sendo por isso usadas na modificação da superfície de eletrodos para construção de sensores e biossensores (LOVE *et al.*, 2005). Além disso, são usadas pequenas quantidades de reagentes para estas modificações diminuindo custos e resíduos.

1.2 MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS

A formação de SAM faz parte das pesquisas das interações entre moléculas e superfícies, um dos aspectos mais estudados dentro das ciências de superfície. As SAM oferecem uma oportunidade única para aumentar a compreensão da auto-organização, relação estrutura-propriedade e fenômeno interfacial. Os estudos utilizando SAM têm sido realizados em diversas áreas como a biologia celular e bioquímica (como suporte para adesão celular, interações ligante-receptor, entre outros); cristalografia e eletrônica molecular (substrato para crescimento de cristais e nanocristais, alinhamento de cristais líquidos, dentre outros); eletroquímica (prevenção de corrosão, litografia em escala nanométrica, sensores e biossensores). O que têm atraído tanto interesse é a possibilidade que essas moléculas apresentam de modificar as propriedades físicas e químicas de uma superfície. Estes sistemas podem possuir ordem desde escala nano até graus maiores de organização. As SAM são camadas moleculares formadas tipicamente a partir da exposição de uma superfície a moléculas com grupos funcionais que possuem forte afinidade por um determinado substrato usado como suporte (ouro, prata, platina, paládio). Essa organização é uma função com as interações químicas entre o substrato e o adsorbato, bem como os tipos e forças das interações intermoleculares (forças de van der Waals, por exemplo) entre os adsorbatos que são necessárias para assegurar a organização e também de interações intramoleculares como torções e estiramento de ligações. Dentre esses sistemas estão as organizações de trialkyl-, trichloro- ou trialkoxysilanos sobre dióxido de silício hidratado, ácidos carboxílicos adsorvidos sobre óxido de alumínio e *n*-alcanotióis sobre superfícies metálicas. Esses compostos

possuem grupos ricos em elétrons (S, O, N) ligados à cadeia formada por *n*-alquilas que podem possuir um grupo funcional terminal. A afinidade entre as superfícies e os grupos ricos em elétrons, é bastante forte para formar ligações iônicas ou covalentes e favorecem interações laterais entre as moléculas adjacentes que mantêm a organização do sistema. Assim, as SAM proporcionam um sistema conveniente, simples e flexível, envolvendo um grande número de substratos e adsorbatos, aumentando o número de suas aplicações (ALLARA, 1995; ULMAN, 1996; SCHWARTZ, 2001; SMITH *et al.*, 2004; LOVE *et al.*, 2005). Na formação de SAM ocorre adsorção química espontânea e irreversível de somente uma camada de moléculas – dispersas em uma solução líquida ou fase gasosa – sobre o substrato. A estabilidade das monocamadas formadas é diretamente proporcional à intensidade das forças de ligação e interação. Os grupamentos alquílicos ficam inclinados (ângulo α) em relação à superfície do ouro (Figura 1) dentro dos limites geométricos que são impostos pela estrutura de cada tiol. Quando outros metais são usados como substrato, o ângulo α também varia (CARVALHAL, 2005; LOVE *et al.*, 2005).

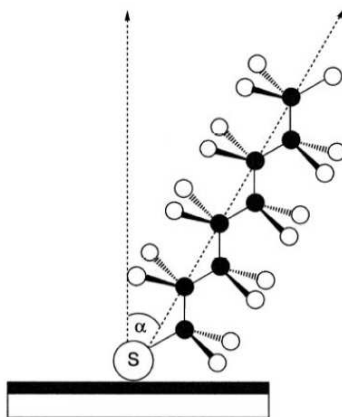


Figura 1- Representação esquemática da inclinação da cadeia alquílica de uma molécula de alcanotiól auto-organizada sobre uma superfície de ouro (FERRETI *et al.*, 2000).

Ainda que diversos substratos metálicos e alcanos funcionalizados tenham sido estudados (WINK *et al.*, 1997; GOODING e HIBBERT, 1999; CHAKI e VIJAYAMOHANAN, 2002), os mais

empregados são os alcanotióis sobre as superfícies de ouro (Figura 2) (BOUBOUR e LENNOX, 2000; KONG *et al.*, 2005; AGBOOLA *et al.*, 2007 e RAOOF *et al.*, 2008). Os alcanotióis possuem em uma de suas extremidades um átomo de enxofre que se liga fortemente ao substrato, uma cadeia orgânica formada basicamente por grupos metilênicos e grupos funcionais terminais que podem ser modificados depois que a camada for disposta sobre a superfície metálica.

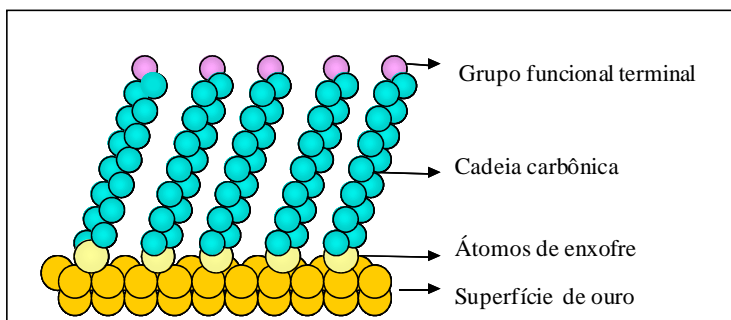


Figura 2 - Monocamadas auto-organizadas sobre a superfície de ouro.

Alcanotióis com grupos terminais $-\text{COOH}$ e $-\text{NH}_2$ (Figura 3), por exemplo, são sensíveis à variação de pH e permitem o controle da densidade de carga da superfície das SAM, conforme o pH da solução em que estas são mergulhadas (LINDGREN *et al.*, 2001; CAMPUZANO *et al.*, 2003). Além disso, com a possibilidade do uso de alcanotióis contendo diferentes grupos funcionais é possível o desenvolvimento de superfícies com funções e características específicas e com elevado nível de controle sobre sua arquitetura molecular, hidrofobicidade e reatividade (FREIRE *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2004; LOVE *et al.*, 2005).

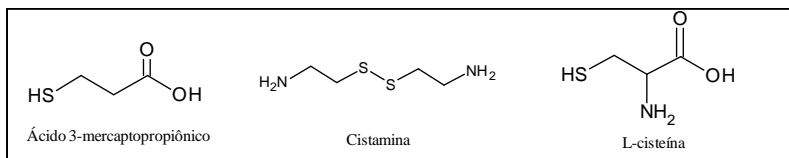


Figura 3 – Alcanotióis com grupos terminais $-\text{NH}_2$ e $-\text{COOH}$.

O ouro é um dos metais mais utilizados na formação dessas monocamadas porque é um metal inerte, de fácil obtenção e possui forte

interação com o enxofre (suficiente para formar ligações covalentes), resultando em uma estrutura altamente ordenada e estável (YANG *et al.*, 1995; CHEN e LI, 2006; HAN e UOSAKI, 2008).

No entanto, o fato de que estas camadas são limitadas por reagentes específicos (tióis, por exemplo) e muitas vezes restritas às superfícies metálicas são consideradas desvantagens das SAM (MATEMADOMBO e NYOKONG, 2007). Entre os fatores que influenciam a estrutura e propriedades das monocamadas sobre as superfícies metálicas está o processo de tratamento do eletrodo; a concentração e composição das moléculas, técnica de imobilização e solvente empregado (CHEN e LI, 2006).

O pré-tratamento dos eletrodos metálicos pode ser feito utilizando-se métodos mecânico (polimento com alumina), químico (oxidação com solução $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ (1:3, v/v); KOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) + H_2O_2 (25%, v/v)) e eletroquímico (voltametria cíclica – varreduras no intervalo de 0 a 1700 mV em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; varreduras no intervalo de -200 a -1200 mV em KOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$). Esta limpeza rigorosa deve ser realizada antes da formação das monocamadas para se obter uma superfície limpa, reativa e eliminar defeitos da superfície metálica (CARVALHAL *et al.*, 2005; FISCHER *et al.*, 2009).

Usando soluções mais diluídas de tiol (concentração milimolar) obtêm-se monocamadas mais ordenadas. A imersão do eletrodo numa solução de tiol é talvez, a técnica mais empregada para a imobilização das monocamadas sobre a superfície de eletrodos. Todavia, o método de aplicação direta de uma concentração conhecida de tiol sobre o eletrodo demonstra semelhante eficiência (CHAKI e VIJAYAMOHANAN, 2002; CHEN e LI, 2006). Após a exposição do substrato de ouro a uma solução ou fase gasosa do tiol, a ligação entre o ouro e o enxofre forma-se rapidamente (SMITH *et al.*, 2004). Como a magnitude das interações intermoleculares entre as cadeias laterais das moléculas de SAM sobre a superfície sólida está fortemente relacionada com a estabilidade das monocamadas, geralmente as monocamadas de cadeia longa são mais estáveis que aquelas de cadeia curta produzindo um alto grau de cobertura. Por outro lado, as SAM de cadeia curta apresentam mais defeitos, mas facilitam a transferência de elétrons nos sensores e biossensores (WEISSHAAR *et al.*, 1993; MENDES *et al.*, 2004).

As propriedades eletroquímicas e estruturais das SAM sobre eletrodos metálicos podem ser também alteradas com a mudança de temperatura. SAM com grupos funcionais terminais apresentam diversas interações (estabilização das ligações de hidrogênio, repulsão eletrostática) que podem ser influenciadas pela temperatura. Com a

diminuição da temperatura diminui-se também a capacitância e a velocidade de transferência de elétrons entre as espécies redox e as SAM. Com o aumento da temperatura aumentam a capacitância e a corrente faradaica (NAKAMURA *et al.*, 2002; CHEN e LI, 2006).

Diversos solventes podem ser utilizados na formação de SAM, mas o etanol é, em geral, o mais utilizado. Isto acontece porque, além de possuir propriedades redutoras sobre a superfície de ouro oxidada, dissolve vários tiocompostos de diferentes tamanhos de cadeia e polaridade. Ainda apresenta pureza adequada, pouca toxicidade e baixo custo. A permeabilidade das SAM de alcanotióis sobre superfície metálica, a qual está relacionada às propriedades de barreira e capacitância interfacial, dependem do solvente usado no meio de adsorção. No entanto, devido à complexidade das interações moléculas-superfícies, ainda são pouco compreendidos os efeitos da escolha do solvente sobre a cinética e o mecanismo de formação das SAM (CHAKI e VIJAYAMOHANAN, 2002; SUR e LAKSHMINARAYANAN, 2004; CHEN e LI, 2006).

As imperfeições nessas monocamadas podem ser causadas tanto por fatores como a limpeza ou método de preparação, mas também pelo fato de que estes sistemas auto-organizados são dinâmicos e possuem complexos comportamentos de fase (CARVALHAL, 2005). Diversos métodos (voltametria, impedância, microscopia, raio-X, espectroscopia no infravermelho) são utilizados para monitorar a qualidade das monocamadas (FREIRE, 2003).

A imobilização de materiais biológicos sobre SAM é muito empregada, sobretudo pela sua versatilidade, simplicidade, tempo de resposta razoável, alta estabilidade e capacidade de produzir estruturas altamente ordenadas (DONG e LI, 1997; GOODING *et al.*, 1999). Ligação covalente de uma proteína, por exemplo, a uma superfície reativa através de resíduos na superfície acessível, muitas vezes necessita de regioespecificidade e, portanto, a orientação correta da proteína imobilizada. A combinação das SAM de alcanotiolatos sobre o ouro é uma técnica que tem proporcionado controlar o caráter da interface, sendo assim muito utilizada na análise e controle da interação de sistemas biológicos com materiais sintéticos (ROBERTS *et al.*, 1998; TINAZLI *et al.*, 2005). A construção de biossensores a partir de SAM é importante no sentido de que estas podem fornecer um microambiente favorável para a atividade biocatalítica de enzimas, pois pode simular membranas que lembram ambientes biológicos originais tornando-se adequadas para a imobilização destas biomoléculas. Além disso, a quantidade do material biológico utilizado na montagem das

monocamadas é mínima, diminuindo assim custos com reagentes. Desta forma, diversos biossensores montados sobre superfícies sólidas, têm essas proteínas como componente chave na camada de reconhecimento interfacial (TLILI *et al.*, 2008).

As características apresentadas pelas SAM possibilitam interações quase específicas entre o material biológico e a superfície eletródica e devido a isso, o seu uso compreende estudos do contato elétrico direto entre eletrodos e proteínas redox, da interação de proteínas com superfícies metálicas e também na fabricação de imunossensores e biossensores enzimáticos (FERRETI, 2000). Além disso, pode ser observada uma redução na corrente relacionada à dupla camada elétrica e, conseqüentemente, um aumento na sensibilidade, proporcionando reprodutibilidade e robustez aos biossensores (CAMPUZANO, 2002). A estabilidade apresentada por estes sensores modificados com SAM possibilita a realização de um grande número de medidas (ALLARA, 1995).

Contudo, existem certas limitações aos biossensores de SAM: as enzimas ficam mais sensíveis às mudanças de pH, temperatura e força iônica; alguns tióis são oxidados durante as investigações não sendo bons para a formação dessas monocamadas; as superfícies de SAM hidrofóbicas podem acumular diversos contaminantes que podem bloquear os sítios de reconhecimento do analito; campo elétrico induzido e dessorção térmica de monocamadas são prejudiciais para a aplicação dos biossensores (CHAKI e VIJAYAMOHANAN, 2002).

Uma das técnicas mais utilizadas na imobilização de proteínas sobre SAM é pela reação dos grupos amino da cadeia lateral da lisina com SAM contendo grupos carboxílicos na sua extremidade após a ativação da carboxila por etildimetilaminopropilcarbodiimida (EDC) e *N*-hidroxisuccinamida (NHS) (FIORINI *et al.*, 2001; GOODING *et al.*, 2001; DELVAUX e CHAMPAGNE, 2003; YUN *et al.*, 2005; SU *et al.*, 2005; CUSMÀ *et al.*, 2007).

Do mesmo modo, é possível também imobilizar novos materiais funcionais sintéticos que imitam sistemas biológicos. Dispositivos que combinam esses materiais apresentam excelente biorreconhecimento podendo ser usados como sensores químicos com diversas funcionalidades tais como diagnóstico, monitoramento ambiental, entre outros. Em adição, estes materiais geralmente são menos sensíveis a mudanças de pH e temperatura, sendo mais vantajosos em alguns casos. Muitos complexos de metaloflalcianinas (com metais de transição – Fe, Co, Mn, Ni) foram imobilizados sobre eletrodos de ouro, principalmente, utilizando a técnica da automontagem com alcanotióis

devido às inúmeras vantagens associadas, variando da simplicidade de fabricação aos baixos limites de detecção. Esses complexos apresentam-se como excelentes eletrocatalisadores para uso em sensores (OZOEMENA *et al.*, 2002; OZOEMENA *et al.*, 2008).

1.3 BIOSSENSORES

Biossensor é um dispositivo analítico que converte uma resposta biológica em um sinal elétrico (Figura 4). O material biológico utilizado pode ser uma enzima, anticorpo, tecido animal ou vegetal, célula, entre outros. Este material é imobilizado junto à superfície de um transdutor (dispositivo capaz de transformar um tipo de sinal em outro) e o sinal elétrico obtido é relacionado à concentração do analito (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992).

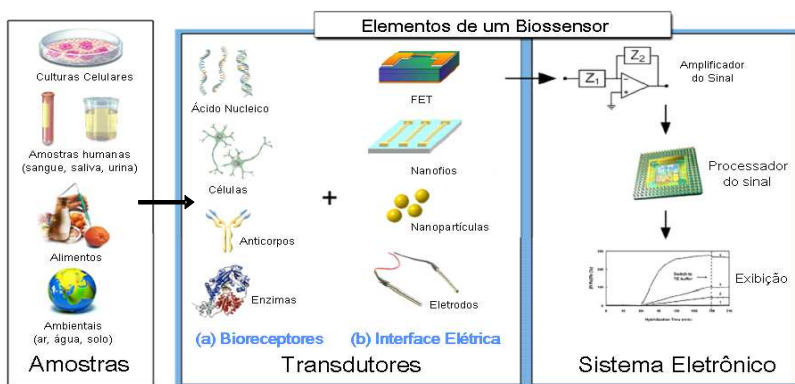


Figura 4 – Componentes de um biossensor típico (GRIESHABER *et al.*, 2008).

Assim sendo, o substrato difunde-se para a superfície do biossensor onde estão imobilizadas as biomoléculas que catalisam a reação, formando os produtos ou consumindo co-substratos eletroativos (H_2O_2 , CO_2 , O_2) através de uma ou mais propriedades físico-químicas (transferência de elétrons, variação de massa, transferência de calor, liberação de gases ou íons, modificação de pH) que são detectadas e medidas pelo transdutor. A escolha do transdutor depende das propriedades do analito de interesse e do material biológico imobilizado. Nos biossensores, o transdutor pode ser eletroquímico (movimento de íons, difusão de espécies eletroativas), óptico (absorção ou emissão de radiação eletromagnética), piezoelétrico (alteração de massa e/ou

microviscosidade) e térmico (mudança de temperatura) (FURTADO *et al.*, 2008). Os biossensores eletroquímicos podem ser amperométricos (baseados na medida de corrente elétrica resultante de oxidação ou redução de espécies eletroativas); potenciométricos (baseados na diferença de potencial entre dois eletrodos, com corrente elétrica constante); condutimétricos (medidas de condutância resultante de produtos de reação catalítica) (THÉVENOT *et al.*, 2001).

A célula eletroquímica (Figura 5) onde as reações são processadas é constituída de um sistema de três eletrodos: um eletrodo de referência (Ag/AgCl ou calomelano saturado) colocado próximo ao eletrodo de trabalho para manter um potencial constante, um contra-eletrodo ou auxiliar (geralmente platina ou outro material condutor e quimicamente estável) que estabelece uma conexão para a solução eletrolítica completando o circuito elétrico e o eletrodo de trabalho (biossensor – onde a reação de interesse ocorre) imersos numa mesma solução (GRIESHABER *et al.*, 2008).

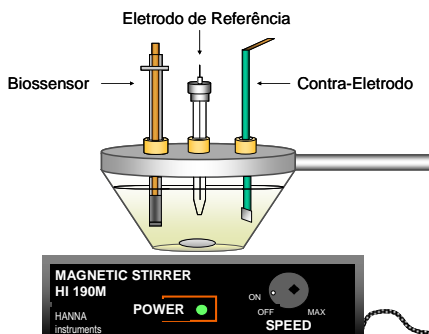


Figura 5 - Célula eletroquímica contendo um biossensor, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar.

O desenvolvimento de biossensores tem crescido constantemente devido às vantagens em relação a outros métodos tais como os cromatográficos. Com relação a esses métodos, apresenta simplicidade, economia, resposta rápida, possibilidade de automação e facilidade de operação. Com esses sensores é possível realizar diversos tipos de análises industriais (controle de processos de produção e avaliação da qualidade de alimentos e de fermentação), análises ambientais (monitoração de poluentes orgânicos, determinação de compostos tóxicos), análises bioquímicas, entre outros.

Quando o material biológico usado na construção de um biossensor é uma enzima, este é denominado de biossensor enzimático. As enzimas não são somente catalisadores eficientes, mas também extremamente seletivos. Entre as enzimas mais usadas na construção de biossensores estão a glicose oxidase e a peroxidase. Nos sensores o reconhecimento do substrato pela enzima é seguido imediatamente pela conversão no correspondente produto, o qual pode ser detectado. Isto permite fazer uso da seletividade e especificidade únicas dessas biomoléculas para as espécies alvo. Assim, eles devem apresentar estabilidade nas condições de trabalho (pH, temperatura, armazenamento), resposta rápida, baixo limite de detecção, precisão e reprodutibilidade (SCHELLER *et al.*, 1989; MARQUES e YAMANAKA, 2008). Os biossensores também podem ser baseados em vegetais como fonte enzimática. A função do extrato enzimático é de gerar ou consumir espécies eletroativas em uma relação estequiométrica com seu substrato ou analito alvo. Muitos extratos de frutos, legumes e verduras foram empregados com sucesso como fonte de peroxidase ou polifenol oxidase na construção e aplicação de biossensores. (FATIBELLO-FILHO *et al.*, 2007).

1.4 ENZIMAS

Enzimas são proteínas sintetizadas em células vivas, catalisam reações termodinamicamente favoráveis e são capazes de agir também fora das células. Assim, a velocidade da reação catalisada é compatível com o processo bioquímico fundamental para a manutenção das células. As proteínas são moléculas compostas por aminoácidos unidos por ligações peptídicas (Figura 6). A proteína nativa é sustentada por interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, ligações dissulfeto e forças de van der Waals. Existe também um grupo de moléculas de RNA que possuem atividade catalítica, as ribozimas, estas moléculas não são proteínas (CAMPBELL, 2000).

As enzimas contêm um centro ativo (parte protéica) chamado de apoenzima e, em alguns casos um grupo não-protéico denominado coenzima (cofator). Os cofatores podem ser metais ou moléculas orgânicas complexas. Quando a enzima está ligada à sua coenzima e/ou íon metálico é então chamada de holoenzima (BERG *et al.*, 2002).

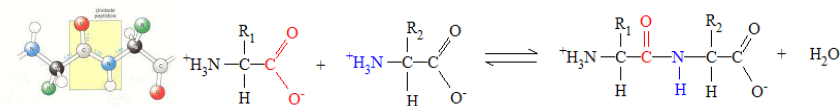


Figura 6 – Ligação peptídica.

As enzimas diminuem a barreira da energia de ativação das reações químicas (Figura 7) sem alterar a constante de equilíbrio (facilitam a formação do estado de transição). Como catalisadores, as enzimas atuam em pequenas concentrações e como não são consumidas na reação podem ser recuperadas. Visto que elas são proteínas, perdem suas propriedades catalíticas se submetidas a agentes como calor, solventes orgânicos, ácidos e bases fortes ou outros materiais que provoquem a sua desnaturação. As características mais intrínsecas das enzimas são a especificidade e poder catalítico (CONN e STUMPF, 1986; LEHNINGER, 1986; BERG *et al.*, 2002).

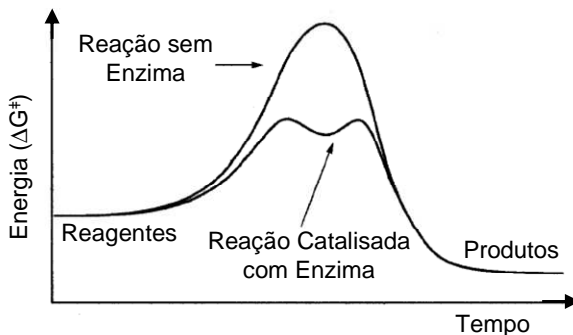
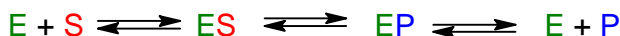


Figura 7 - Representação comparativa da energia de ativação de uma reação não enzimática e uma reação enzimática.

Os componentes da reação enzimática são descritos a seguir:



E, S e P representam a enzima, substrato e produto, respectivamente. ES representa o complexo enzima-substrato e EP o complexo enzima-produto.

Devido à sua estrutura tridimensional complexa, as enzimas possuem um alto grau de especificidade sendo esta uma importante característica das mesmas. Uma enzima seleciona uma substância para reagir devido à configuração da molécula protéica, da singularidade de seu sítio ativo (cavidade com forma tridimensional definida, constituída por grupos de aminoácidos) e da conformação estrutural da molécula do substrato. Assim, para ser reconhecida como substrato, uma molécula deve possuir forma apropriada para acomodar-se no sítio ativo e grupos químicos capazes de se ligar nos grupos R dos aminoácidos presentes. As enzimas aceleram as reações químicas específicas sem a formação de produtos secundários e funcionam em soluções aquosas em condições suaves de pH e temperatura (CONN e STUMPF, 1986; LEHNINGER, 1986; BERG *et al.*, 2002).

Para que a catálise enzimática ocorra, o substrato deve ligar-se ao sítio ativo da enzima. Cada enzima tem seu próprio e único mecanismo de catálise. Têm sido elucidados vários fatores físicos e químicos relacionados à catálise enzimática, mas nem todos estão presentes simultaneamente e o fator de maior impacto varia de caso a caso. Dentre os fatores responsáveis pela catálise enzimática está a catálise do tipo covalente, ácido-base, ativação por metais, efeitos de proximidade e orientação, desestabilização do substrato e/ou enzima e o efeito de estabilização do estado de transição (BERG *et al.*; 2002; FERREIRA, 2008).

As enzimas são classificadas em seis principais grupos de acordo com as reações que catalisam: oxidorredutases (reações de transferência de elétrons); transferases (reações de transferência de grupos funcionais); hidrolases (reações de hidrólise – promovem a cisão de um material orgânico através do uso de água); liases (adição de grupos a duplas ligações ou o inverso – rompem ligações glicosídicas); isomerases (catalisam rearranjos intramoleculares – transferência de grupos dentro de moléculas produzindo formas isoméricas) e ligases (formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à clivagem de ATP) (CONN e STUMPF, 1986; LEHNINGER, 1986).

Como o mecanismo celular dos sistemas vivos depende das enzimas, a fonte primária delas são os tecidos animais, vegetais e culturas de microorganismos. A produção de enzimas pode ser aumentada pela transferência das informações genéticas para um

microorganismo hospedeiro conhecido, por meio de técnicas de DNA recombinante. Esses microorganismos geneticamente modificados podem ser cultivados sob as melhores condições favorecendo a produção da enzima em grande escala (SHU *et al.*, 2010). A ampla aplicação (indústria, agricultura, medicina, pesquisa) de enzimas possibilita que elas sejam usadas em diversos processos (tratamento de efluentes, biorremediação de solos, fabricação de cervejas, produção de detergentes, síntese orgânica, na indústria de aromas, fármacos, cosméticos e perfumaria) inclusive em métodos analíticos na construção de biossensores (HASAN *et al.*, 2006).

1.4.1 Peroxidase

Peroxidase é uma enzima que pertence ao grupo das oxidorredutases. As enzimas pertencentes a este grupo estão relacionadas com as oxidações e reduções biológicas, e, consequentemente, com os processos fermentativos e respiratórios (CONN e STUMPF, 1986). Uma das aplicações desta enzima é na construção de biossensores e na síntese orgânica, imobilizada em diferentes matrizes. Está sendo muito utilizada também em estudos de biotecnologia associados a várias áreas de pesquisa. A peroxidase consegue manter uma resposta estável por longos períodos a temperatura ambiente e em um amplo intervalo de pH. Além disso, o seu custo é relativamente baixo e é encontrada comercialmente em diversos graus de pureza (MACIEL *et al.*, 2007; ULIANA *et al.*, 2008).

Esta enzima é ainda encontrada em diversos vegetais especialmente frutos e legumes, e o seu extrato bruto, tecido ou fibra são usados como fonte enzimática na construção de biossensores onde as enzimas podem ser imobilizadas em diversos tipos de matrizes (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002; LEITE *et al.*, 2003; FELIX *et al.*, 2006; KOZAN *et al.*, 2007). Muitos biossensores a base de peroxidase foram desenvolvidos para a detecção de peróxido de hidrogênio, aminas aromáticas, fenóis, hidroperóxidos orgânicos, herbicidas (RUZGAS, 1996).

Nos biossensores, a peroxidase é um eficiente biocatalisador participando na transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo. A Figura 8 demonstra um esquema ilustrativo de um biossensor contendo peroxidase para análise de um difenol. A peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio catalisa a oxidação de um *o*-difenol em sua correspondente *o*-quinona e, posteriormente a quinona formada é reduzida eletroquimicamente na superfície do biossensor.

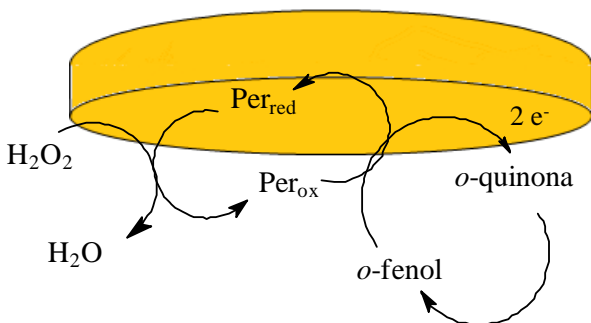


Figura 8 – Biossensor contendo peroxidase para análise de um difenol.

Peroxidases catalisam a oxidação de diversos compostos orgânicos e inorgânicos na presença de peróxidos e, também, uma variedade de reações de transferência de oxigênio (sulfoxidações, epoxidações, hidroxilações) a partir de um mecanismo complexo de reações. Muitas peroxidases são heme proteínas e contém ferro(III) protoporfirina IX como grupo prostético (Figura 9) e o seu ciclo catalítico (Figura 10) ocorre em três etapas: a forma férrica da enzima é oxidada pelo peróxido de hidrogênio ao chamado composto I, que é o radical oxiferril. Através da transferência de um elétron do substrato, o composto I é então reduzido à forma conhecida como composto II e retorna a sua fase inicial por uma nova transferência de elétron de uma molécula de substrato para a enzima. Sendo assim, as espécies fenólicas atuam como doadores de elétrons nessas reações enzimáticas. As enzimas imobilizadas no eletrodo podem ser oxidadas pelo peróxido de hidrogênio e então reduzidas por elétrons oriundos do eletrodo. (FERAPONTOVA, *et al.*, 2001; REGALADO *et al.*, 2004; VEITCH, 2004; FATIBELLO-FILHO *et al.*, 2007; ULIANA, 2008).

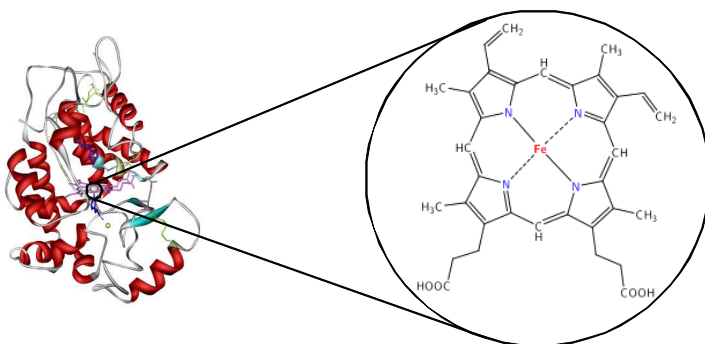


Figura 9 – Protoporfirina, sítio ativo de muitas peroxidases.

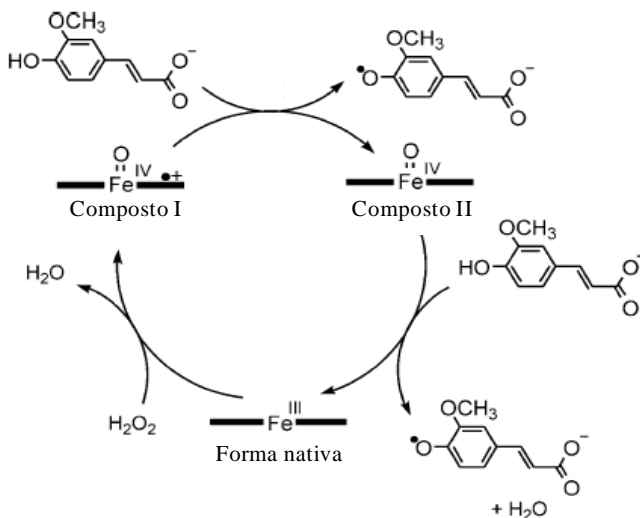


Figura 10 – Ciclo catalítico da peroxidase (VEITCH, 2004).

Na Figura 10, o composto I é o composto oxidado intermediário ferro oxiferril e cátion radical π porfirínico [$\text{Fe}^{4+}=\text{O}$, R^+]; o substrato doador de elétron é representado pelo ácido ferúlico e o composto II é o composto oxidado intermediário [$\text{Fe}^{4+}=\text{O}$].

1.5 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A habilidade das enzimas para catalisar reações fez delas indispensáveis para a ciência por décadas e consequentemente os métodos de imobilização são uma poderosa ferramenta para melhorar muitas propriedades enzimáticas.

A imobilização de enzimas é um método que consiste em confinar ou ligar a enzima num determinado suporte mantendo sua ação catalítica. É muito utilizada quando se pretende obter um aumento da estabilidade e possibilidade de reutilização do sistema catalisador podendo minimizar ou até mesmo eliminar problemas encontrados com a aplicação de enzimas livres, tais como, facilidade de desnaturação, inativação pelo pH, temperatura ou solventes orgânicos (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Para permitir o uso contínuo dos biossensores, aumentar o sinal de resposta e especificidade é necessário a incorporação estável dos elementos de reconhecimento e, para isso, têm sido desenvolvidas várias técnicas de imobilização. A imobilização pode ser obtida por encapsulação (em matriz ou membrana), por adsorção física ou iônica e por ligação covalente (em suporte ou ligação cruzada entre a enzima e o suporte), sendo os métodos mais comuns a adsorção física, oclusão em gel, ligação covalente e ligação covalente cruzada (Figura 11) (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007). O método mais apropriado é escolhido de acordo com o transdutor utilizado e a aplicação que será realizada.

A escolha adequada de um determinado suporte para a imobilização de enzimas é importante, visto que pode proporcionar a reutilização das enzimas, aumentar sua estabilidade, reduzir custos e, em alguns casos, aumentar a atividade enzimática. Por outro lado, uma escolha inadequada do suporte pode não somente afetar o tempo de vida da enzima como também o desempenho de todo o sistema. Nesse sentido, diversos tipos de reagentes e suportes têm sido investigados no processo de imobilização. Dentre os reagentes mais usados estão a carbodiimida, epicloridrina, glutaraldeído, triclorotriazina; dentre os suportes empregados estão quitina, quitosana, sílica e dextrana (OLIVEIRA e VIEIRA, 2006; GOMES *et al.*, 2006). Recentemente, líquidos iônicos também estão sendo utilizados na imobilização de enzimas em sensores, mostrando boa compatibilidade e protegendo as biomoléculas (WEI e IVASKA, 2008).

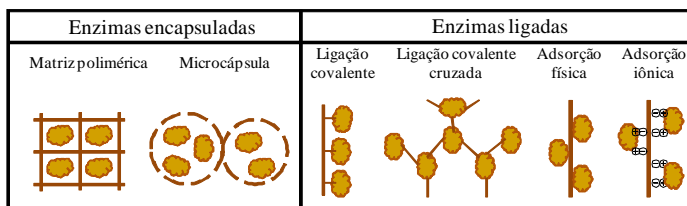


Figura 11 – Métodos de imobilização de enzimas.

Ainda que os métodos de imobilização anteriormente citados sejam os mais comumente empregados na construção de biossensores, podem produzir uma superfície altamente desorganizada, provocando mudanças conformacionais que afetam a capacidade funcional do componente bioativo. Assim, somente uma pequena quantidade de enzimas na superfície do sensor permanece ativa (CHAKI e VIJAYAMOHANAN, 2002). Diante disto, as SAM estão sendo muito utilizadas com objetivo de se obter estruturas mais organizadas e versáteis para a imobilização de enzimas na modificação de superfícies eletródicas para a fabricação de biossensores.

1.6 MOLÉCULAS SINTÉTICAS FUNCIONAIS

O desenvolvimento de moléculas sintéticas visa a obtenção de uma determinada funcionalidade ou propriedade como o reconhecimento molecular ou condutividade elétrica. Um dos aspectos interessantes para que o reconhecimento molecular (por exemplo) ocorra é a formação de ligações lábeis. Uma ligação que apresenta características ideais é a ligação coordenada metal-ligante, em que as ligações individuais podem se formar e quebrar, mais ou menos rapidamente, até o sistema alcançar a situação de menor energia (ARAKI e TOMA, 2002). Teoricamente, qualquer abordagem para imobilizar receptores funcionais ou reagentes de reconhecimento molecular sobre a superfície de um eletrodo irá funcionar. As abordagens incluem a ligação covalente, eletropolimerização, adsorção eletrostática, filmes Langmuir-Blodgett e SAM de tióis ancorados sobre ouro (UMEZAWA e AOKI, 2004).

Devido às características favoráveis dos compostos de coordenação, a química de coordenação tem se destacado bastante nos últimos anos. Dentre estas características estão a ocorrência de diversas geometrias e números de coordenação, possibilidade de se obter

supermoléculas por meio de reações de automontagem juntamente com as propriedades redox e catalíticas, dentre outras (ARAKI e TOMA, 2002). O estudo de compostos modelo contribui significativamente na compreensão do papel dos metais de transição nos sítios ativos das enzimas e da relação estrutura/função (NEVES *et al.*, 2003).

Muitos complexos modelos de metaloenzimas têm sido sintetizados apresentando diversas atividades funcionais. Estes compostos podem ser usados na construção de sensores altamente sensíveis e estáveis empregados no monitoramento e detecção de uma diversidade de analitos. Um exemplo é o trabalho de Peralta *et al.*, 2006, que sintetizou um complexo modelo de catecol oxidase (enzima que contém cobre dinuclear). Com base nos experimentos cinéticos verificaram que o composto apresentou boa atividade catalítica. Além disso, o complexo também apresentou a propriedade de clivagem do DNA. Este material foi utilizado na construção de um sensor biomimético, no qual o complexo foi imobilizado sobre um eletrodo de ouro com um filme de quitosana e utilizado para determinação de dopamina em formulações farmacêuticas (FERNANDES *et al.*, 2010). Do mesmo modo, complexos metálicos eletroativos, cromofóricos e fluorescentes integrados a um eletrodo de ouro através de SAM têm sido amplamente utilizados como modelos de moléculas funcionais para o desenvolvimento da química, eletroquímica, bioquímica e dispositivos eletrônicos devido à sua reatividade química (HAYASHI *et al.*, 2003; EBERSPACHER *et al.*, 2003; ZAGAL *et al.*, 2010).

1.7 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

As técnicas eletroanalíticas têm assumido um importante lugar na identificação e quantificação de moléculas e substâncias de interesse em diferentes áreas de estudo. Estas técnicas permitem a formação de relações diretas entre a concentração do analito e propriedades elétricas como a condutividade, corrente, potencial, resistência ou carga. Além disso, os materiais e instrumentação utilizados geralmente têm menor custo que as técnicas espectroscópicas e cromatográficas e o tempo gasto na realização das análises também é menor. Quando a reação eletroquímica é particularmente seletiva, é possível também a determinação do analito diretamente na matriz com a presença de potenciais interferentes. Estas vantagens fizeram com que elas sejam cada vez mais utilizadas e sua importância levou ao desenvolvimento de técnicas mais sensíveis para as espécies em estudo (SMYTH, 1992; SOUZA *et al.*, 2003). Diversas técnicas são utilizadas nos estudos

eletroanalíticos para a avaliação de biossensores e dentre as mais usadas ultimamente estão a voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada, cronoamperometria e impedância eletroquímica. Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a técnica de voltametria de onda quadrada, a qual será discutida a seguir.

1.7.1 Voltametria de Onda Quadrada

Esta é uma técnica de pulso que oferece vantagens como maior intensidade de sinal, melhor resolução do pico, medidas mais rápidas e maior sensibilidade, podendo seu limite de detecção ser comparado ao de técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

Também a corrente faradaica pode ser coletada num intervalo de tempo adequado para diminuir a contribuição da corrente capacitiva. A análise de seus parâmetros característicos permite ainda, a avaliação mecanística e cinética dos processos eletródicos (SOUZA *et al.*, 2003).

Nesta técnica, ocorre um pulso direto e um pulso inverso. No primeiro é produzida uma corrente catódica i_1 e no segundo uma corrente anódica i_2 . A forma da curva de corrente *vs* potencial é proveniente da aplicação de potenciais de altura ΔE_s (amplitude do pulso de potencial), que varia de acordo com uma escada de potencial de largura E_s (incremento) e período τ (duração do pulso). O perfil da variação de potencial está representado na Figura 12 e consiste na superposição de uma onda quadrada a uma função rampa escalonada em degraus. Durante cada pulso catódico, o analito se reduz na superfície do eletrodo, e durante o pulso anódico, o analito reduzido volta a se oxidar. No ponto 1, os elétrons fluem do eletrodo para o analito, e no ponto 2 na direção inversa. As correntes são medidas ao final dos pulsos diretos e reversos e o sinal é obtido como uma intensidade da corrente resultante (Δi) de forma diferencial (Figura 13), ou seja, como as duas correntes têm sinais opostos, sua diferença é maior que qualquer uma das correntes em separado. Os limites de detecção para esta técnica voltamétrica são da ordem de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹ (SKOOG *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003; HARRIS, 2005).

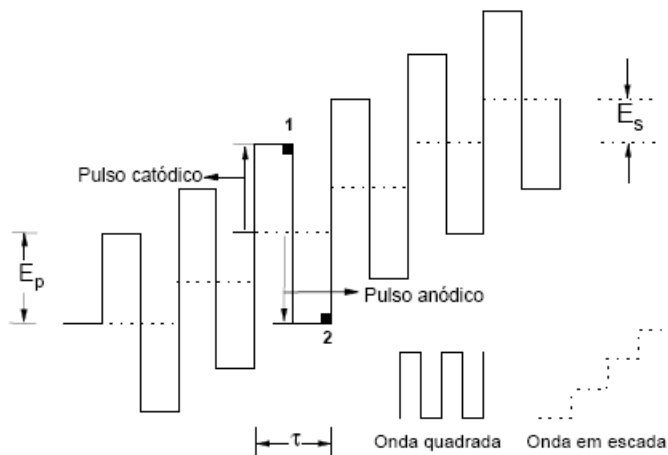


Figura 12 – Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada

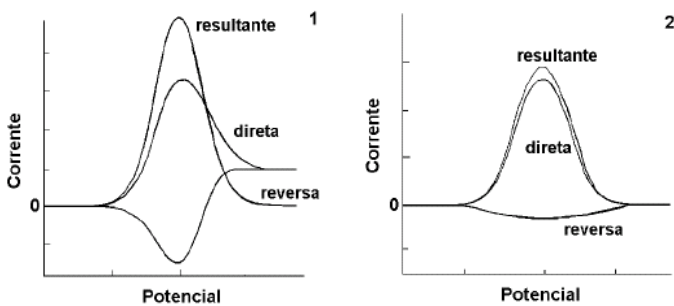


Figura 13 – Voltamogramas de onda quadrada (1) processo redox de um sistema reversível e (2) processo redox de um sistema irreversível (SOUZA *et al.*, 2003).

1.8 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo construir novos sensores a partir da modificação da superfície de eletrodos de ouro com camadas auto-organizadas de tióis combinada ao uso de biomoléculas provenientes de extratos vegetais e de moléculas sintéticas funcionais. Os sensores obtidos serão utilizados para determinação de dopamina, tiodicarbe e catequina em amostras de interesse farmacêutico e alimentício.

1.8.1 Objetivos Específicos

1.8.1.1. Biossensores contendo peroxidase imobilizada sobre SAM de L-cisteína

- Obter extratos de brotos de feijão (*Vigna radiata*) e de alfafa (*Medicago sativa*) para utilização como fonte enzimática.
- Determinar a atividade da peroxidase por método espectrofotométrico.
- Construir os biossensores utilizando monocamadas auto-organizadas de L-cisteína e enzima peroxidase sobre a superfície de eletrodos de ouro.
- Avaliar e otimizar as respostas dos biossensores propostos utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada.
- Aplicar os biossensores na determinação de dopamina em fármacos e tiodicarbe em frutas e legumes.
- Comparar os resultados obtidos utilizando os biossensores e os métodos oficiais.

1.8.1.2. Sensor contendo complexo de níquel (II) imobilizado sobre SAM de ácido 3-mercaptopropiônico

- Utilizar um complexo de níquel (II) como molécula funcional eletrocatalítica na construção de um sensor usando monocamadas auto-organizadas de ácido 3-mercaptopropiônico.
- Avaliar e otimizar as respostas do sensor utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada.
- Aplicar o sensor na determinação de catequina em chá verde.
- Comparar os resultados obtidos usando o sensor proposto e o método comparativo.

CAPÍTULO 1 BIOCSENSOR CONTENDO PEROXIDASE IMOBILIZADA EM MONOCAMADA AUTO-ORGANIZADA DE L-CISTEÍNA PARA DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA

2.1 RESUMO

Neste trabalho, a enzima peroxidase de broto de feijão (*Vigna radiata*) foi imobilizada sobre um eletrodo de ouro modificado com monocamadas auto-organizadas de L-cisteína (Au-SAM-broto de feijão) e aplicado na determinação de dopamina em fármacos. A voltametria de onda quadrada foi a técnica utilizada na otimização do biossensor e quantificação dessa substância. Na superfície do biossensor, a peroxidase, na presença de peróxido de hidrogênio, catalisou a oxidação de dopamina à sua correspondente *o*-quinona. Esta, por sua vez, foi eletroquimicamente reduzida à dopamina em potencial de +0,15 V vs Ag/AgCl. O desempenho do sensor foi avaliado e a maior resposta foi obtida usando solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0); solução de peróxido de hidrogênio 6,0x10⁻⁵ mol L⁻¹; frequência de 100 Hz; amplitude de pulso de 80 mV e incremento de 4,0 mV. A curva analítica foi linear para concentrações de dopamina de 9,91x10⁻⁶ a 2,21x10⁻⁴ mol L⁻¹ com limite de detecção de 4,78x10⁻⁷ mol L⁻¹ e limite de quantificação de 1,60x10⁻⁶ mol L⁻¹. A recuperação de dopamina variou de 98,0 a 111,8% e o desvio padrão relativo foi de 3,1 % para uma solução 1,30x10⁻⁵ mol L⁻¹ de dopamina (n=6). O tempo de vida deste biossensor foi de 15 dias (300 determinações). Os resultados obtidos na determinação de dopamina em fármacos com o eletrodo Au-SAM-broto de feijão proposto estão de acordo com aqueles obtidos com o método espectrofotométrico em um nível de 95%.

2.2 INTRODUÇÃO

Os biossensores que utilizam componentes biológicos juntamente com as SAM têm demonstrado alta seletividade e sensibilidade apresentando potencial para aplicação em análises alimentícias, clínicas e ambientais (ROSSATO *et al.*, 2001; CHAKI e VIJAYAMOHANAN, 2002; FREIRE *et al.*, 2003). Um dos materiais biológicos mais usados na construção desses biossensores é a enzima peroxidase (BOGDANOSKAYA e TARASEVICH, 1996; GASPAR *et al.*, 2000, ALPEEVA *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2007; MAZZEI *et al.*, 2007) a qual também foi usada neste trabalho para a determinação de dopamina.

A dopamina (Figura 14) é uma catecolamina extensivamente estudada e tem atraído muita atenção dos pesquisadores por ser um importante neurotransmissor químico envolvido na transmissão de sinais de um neurônio para outro através das sinapses (KUMAR *et al.*, 2008), portanto, sua determinação é de grande importância. Os baixos níveis de dopamina estão relacionados com distúrbios neurológicos, como esquizofrenia, epilepsia, doença de Parkinson e infecção pelo HIV (LI *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007). A dopamina é utilizada para o tratamento de diversos tipos de choques e da hipotensão grave após infarto agudo do miocárdio, dilatando os vasos sanguíneos renais e aumentando desta forma o fluxo de sangue (RANG e DALE, 1993). No Brasil, geralmente é comercializada em forma de ampolas contendo 5 mg mL⁻¹ de dopamina.

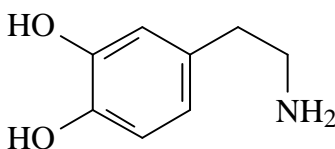


Figura 14 – Estrutura da dopamina

Dentre os métodos mais empregados para a determinação de dopamina estão os cromatográficos (CARRERA *et al.*, 2007; YOSHITAKE *et al.*, 2007), espectrofotométricos (NAGARAJA *et al.*, 1998; NAGARAJA *et al.*, 2001) e os eletroquímicos. Estes últimos têm apresentado muitas vantagens na determinação de catecolaminas, sendo desenvolvidos vários tipos de sensores e biossensores com esta finalidade (LIU *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2005; FELIX *et al.*, 2006; ZUCOLOTTI *et al.*, 2006; MATHIVASARU *et al.*, 2007).

Vários sensores modificados para a determinação de dopamina são relatados na literatura. Codognoto *et al.* (2007) descreveram sobre a determinação desta catecolamina em formulações farmacêuticas usando um eletrodo de ouro modificado com SAM do ácido 3,3-ditiopropiônico. As concentrações determinadas nas amostras variaram entre 4,74 e 4,85 mg mL⁻¹ de dopamina e a precisão encontrada foi de 1,8%. O comportamento voltamétrico deste analito foi investigado por Liu *et al.* (2004) num eletrodo modificado com SAM de *N*-acetilcisteína. Um par de picos redox bem definido foi obtido e a corrente de pico de oxidação aumentou linearmente com a concentração no intervalo de $1,0 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Em adição, vários eletrodos modificados que empregaram diferentes técnicas tais como eletroquímica, ligação covalente, Langmuir-Blodgett e layer-by-layer foram desenvolvidos com sucesso para a determinação deste composto (ZEN e CHEN, 1997; KATO *et al.*, 2005, SHERVEDANI *et al.*, 2006, ZUCOLOTTI *et al.*, 2006, MANJUNATHA *et al.*, 2010).

Neste trabalho, a L-cisteína foi usada para formar SAM versáteis e fortemente ligadas à superfície do eletrodo de ouro através do grupo mercapto. O grupo carboxila de L-cisteína tornou possível imobilizar a peroxidase de broto de feijão através da ativação deste grupo com cianamida e reticulação dos grupos amino da enzima com o glutaraldeído. As condições experimentais para o melhor desempenho analítico do eletrodo enzimático foram otimizadas para detecção de dopamina em formulações farmacêuticas.

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, obtidos comercialmente e todas as soluções foram preparadas com água deionizada. A L-cisteína, cianamida, glutaraldeído 25% (m/v), guaiacol, peróxido de hidrogênio 30% (m/v), ácido sulfúrico, álcool etílico e dopamina foram adquiridos da Sigma. A suspensão aquosa de alumina (0,3 e 0,05 µm) foi obtida da Aratec. Fosfato de sódio monobásico e dibásico foram adquiridos da Synth e ácido acético da Merck. Foram utilizados hidróxido de sódio e acetato de sódio da marca F. Maia e ácido fosfórico da Nuclear. As amostras de Revimine® (ampolas contendo 5,0 mg mL⁻¹ de dopamina) foram doadas pela farmácia do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago. Os brotos de

feijão (*Vigna radiata*) foram adquiridos em um mercado de Florianópolis.

As soluções $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato foram preparadas dissolvendo-se 11,998 g de monohidrogenofosfato de sódio e 14,196 g de hidrogenofosfato de sódio em um béquer com água destilada. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 1,0 L no qual foi completado o volume. Para o ajuste dos pH 7,0 e 8,0 foram adicionadas gotas de solução $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio e para o ajuste do pH 6,0 foram adicionadas gotas de ácido fosfórico concentrado.

A solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão acetato foi preparada dissolvendo-se 8,2 g de acetato de sódio em um béquer contendo água destilada e adicionados 5,7 mL de ácido acético concentrado. Em seguida, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 1,0 L e o volume completado com água destilada. Para o ajuste do pH 5,0 foram adicionadas gotas de solução $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio.

Foi preparada uma solução alcoólica $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de L-cisteína dissolvendo-se 1,7 mg desta substância em álcool etílico e completando-se o volume em um balão volumétrico de 10,0 mL.

A solução $0,36 \text{ mol L}^{-1}$ de cianamida foi preparada dissolvendo-se 150,0 mg deste reagente em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0) em um balão volumétrico de 10,0 mL.

A solução $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de dopamina foi obtida dissolvendo-se 9,5 mg desta substância com solução tampão fosfato pH 7,0 em um balão volumétrico de 10,0 mL.

A solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) foi preparada transferindo-se 1,0 mL de glutaraldeído 25% para um balão volumétrico de 10,0 mL e completando-se o volume com água deionizada.

A solução “piranha” (H_2SO_4 concentrado/ H_2O_2 30% (3:1, v/v)) foi preparada transferindo-se 6,0 mL de ácido sulfúrico para um béquer seguido da adição gota a gota de 2,0 mL de peróxido de hidrogênio.

Para o preparo da solução $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de guaiacol diluiu-se 140 μL deste reagente em tampão fosfato (pH 7,0) em um balão volumétrico de 25,0 mL.

A solução estoque $9,80 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio foi preparada utilizando-se 1,0 mL desta substância concentrada e completando-se o volume de 100,0 mL em um balão volumétrico com tampão fosfato (pH 7,0). A solução de trabalho ($9,80 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada diariamente a partir da diluição de uma alíquota de 1,0 mL da solução estoque em balão volumétrico de 10,0 mL com tampão fosfato pH 7,0.

2.3.2 Instrumentação

As pesagens foram realizadas em uma balança analítica da marca Shimadzu, modelo AY320, com quatro casas decimais.

As soluções tiveram seus valores de pH ajustados com o auxílio de um pH-metro Micronal modelo B474.

Foram utilizadas pipetas automáticas de volume variável das marcas LabMate e Digipet.

Um aparelho de ultrassom modelo UltraCleaner 1400A da marca Unique, frequência 55 KHz foi utilizado para a limpeza do eletrodo.

Para a obtenção do extrato enzimático homogeneizou-se o vegetal em um liquidificador Black & Decker modelo IB 900. O extrato foi filtrado em um filtro da marca Sartorius acoplado a uma bomba de vácuo da marca Tecnal, modelo TE-0581.

As medidas espectrofotométricas para a determinação da atividade da enzima peroxidase foram realizadas em um espectrofotômetro modelo B572 da marca Micronal. Foi usada uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico para efetuar as medidas.

A determinação de dopamina pelo método comparativo foi efetuada em um espectrofotômetro UV-vis Hewlett-Packard (Boise, ID, USA), modelo 8452A, com cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico.

Um agitador magnético modelo HI 190 M da marca Hanna foi utilizado para a homogeneização das soluções.

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT 12 da marca Autolab® (Eco Chemie) acoplado a um microcomputador e controlado pelo software GPES (versão 4.9.006, Eco Chemie). Para tais medidas foi empregada uma cela eletroquímica de vidro, sem compartimento divisório, com capacidade para 40,0 mL e tampa de Teflon® contendo orifícios circulares para o encaixe dos eletrodos e adição das soluções.

O biossensor construído a partir da modificação química de um eletrodo de ouro com 2,0 mm de diâmetro foi usado como eletrodo de trabalho. O contra-eletrodo utilizado foi uma placa de platina com 0,5 cm x 1,0 cm e um eletrodo de referência de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) com solução interna de KCl 3,0 mol L⁻¹. As medidas foram executadas em temperatura ambiente e sem deaeração.

2.3.3 Obtenção da Peroxidase de Vegetal

A enzima peroxidase foi obtida dos brotos de feijão de acordo com o seguinte procedimento: 25,0 g do vegetal lavado e seco foram homogeneizados em um liquidificador com 100 mL de solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 7,0) durante 1 minuto. Em seguida, o homogenato obtido foi filtrado em um filtro conectado a uma bomba de vácuo. A solução sobrenadante foi armazenada em um frasco âmbar em refrigerador a 4 °C e utilizada como fonte da enzima peroxidase para a construção do biossensor (VIEIRA *et al.*, 1999; LEITE *et al.*, 2003).

2.3.4 Determinação da Atividade Enzimática

A atividade da peroxidase obtida do broto de feijão foi determinada em triplicata medindo-se a absorbância em 470 nm do tetraguaiacol (produto da oxidação do guaiacol). Esta medida foi realizada utilizando soluções preparadas em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0): 2,7 mL de solução 0,05 mol L⁻¹ de guaiacol, 0,2 mL de solução da enzima e 0,1 mL de solução 9,8x10⁻³ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio. Uma unidade de peroxidase foi definida como a quantidade de enzima suficiente para produzir 0,001 unidade de absorbância por minuto. Os experimentos controle (brancos) foram realizados usando o mesmo procedimento com ausência da peroxidase (VIEIRA e FATIBELLO-FILHO, 1998; VIEIRA *et al.*, 1999).

2.3.5 Pré-tratamento da Superfície do Eletrodo de Ouro

A limpeza da superfície dos eletrodos de ouro é uma etapa importante, pois exerce grande influência na qualidade da formação das monocamadas auto-organizadas. Assim sendo, utilizou-se três diferentes procedimentos de limpeza: polimento mecânico, tratamento químico e limpeza eletroquímica.

Inicialmente as superfícies dos eletrodos foram polidas com uma suspensão aquosa de alumina 0,3 e 0,05 µm sobre uma flanela até adquirirem aspecto espelhado e, então, foram lavadas com água deionizada. Em seguida, foram colocados em um banho ultrassônico (em água e depois em etanol) durante 1 min cada, para remover partículas residuais de alumina da superfície eletródica. Após esta limpeza mecânica, os eletrodos foram submetidos a um tratamento químico através da imersão dos mesmos em uma solução piranha por um período de 10 minutos seguido da lavagem com água deionizada.

Finalmente, foram limpos eletroquimicamente em uma solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ aplicando-se varreduras sucessivas entre a janela eletroquímica ($0,0 \text{ V}$ a $1,7 \text{ V}$ vs Ag/AgCl) em 100 mV s^{-1} até que os voltamogramas cíclicos característicos para um eletrodo de ouro limpo foram observados (CARVALHAL *et al.*, 2005).

2.3.6 Construção do Biossensor

Após o pré-tratamento da superfície do eletrodo de ouro, este foi deixado em etanol absoluto por aproximadamente 15 min e, em seguida, imerso em uma solução etanólica $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de L-cisteína durante 1 hora. O eletrodo modificado foi então retirado da solução do tiol, lavado com álcool etílico absoluto a fim de remover as moléculas fisicamente adsorvidas e seco à temperatura ambiente. Após a formação das SAM de L-cisteína, a superfície modificada foi mergulhada em uma solução $0,36 \text{ mol L}^{-1}$ de cianamida por 1 h. Após este período, o sensor foi seco à temperatura ambiente e $30,0 \text{ unidades mL}^{-1}$ de peroxidase do broto de feijão foram depositadas sobre a sua superfície. Para manter a enzima covalentemente ligada, o eletrodo foi introduzido por 1 h em uma solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) e seco à temperatura ambiente. O biossensor construído foi armazenado em temperatura ambiente quando não usado.

2.3.7 Medidas Eletroquímicas

As medidas de voltametria de onda quadrada foram realizadas pela aplicação de potenciais no intervalo de $+0,7$ a $-0,8 \text{ V}$ vs Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) em uma cela eletroquímica contendo 15 mL de solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6,0) e $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. Alíquotas de solução padrão de dopamina ou solução das amostras foram transferidas para a cela através de micropipeta e, após um tempo de agitação de 60 segundos para a homogeneização da solução, os voltamogramas foram registrados com auxílio de um microcomputador. A fim de otimizar o método proposto, foram estudados os parâmetros de voltametria de onda quadrada: frequência (10–120 Hz), amplitude de pulso (10–120 mV) e incremento (0,5–5,0 mV). Após a otimização desses parâmetros, foi construída uma curva analítica e realizados os estudos de recuperação e determinação de dopamina em amostras farmacêuticas usando o método de adição de padrão.

2.3.8 Método Comparativo para Determinação de Dopamina

A técnica de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta foi utilizada como método comparativo para a determinação de dopamina (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1977) em comprimento de onda de 280 nm. Foi construída uma curva analítica a partir da concentração de dopamina em função da absorbância, a qual foi utilizada para quantificação deste composto (método do padrão externo).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Obtenção e Determinação da Atividade da Peroxidase

Para o desenvolvimento deste trabalho, brotos de feijão foram selecionados como fonte de peroxidase por apresentarem maior atividade enzimática quando comparados com outros vegetais estudados (VIEIRA *et al.*, 2003; FERNADES *et al.*, 2007), baixo custo, fácil aquisição e por ser um vegetal ainda não utilizado como fonte desta enzima na construção de biossensores. O extrato obtido do broto de feijão foi submetido à análise espectrofotométrica para avaliação de sua atividade. Na reação enzimática, o peróxido de hidrogênio é reduzido, enquanto um doador de elétrons é oxidado. Para isso foi utilizado um comprimento de onda de 470 nm para acompanhar o tetraguaiacol, produto formado a partir da reação do guaiacol com a peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio (Figura 15). Na Figura 16 pode ser observado o gráfico da absorbância *vs* tempo a partir do qual a atividade pode ser determinada usando a parte linear do gráfico. Desta forma, os valores obtidos foram substituídos na Equação 1 e calculada a atividade da enzima.

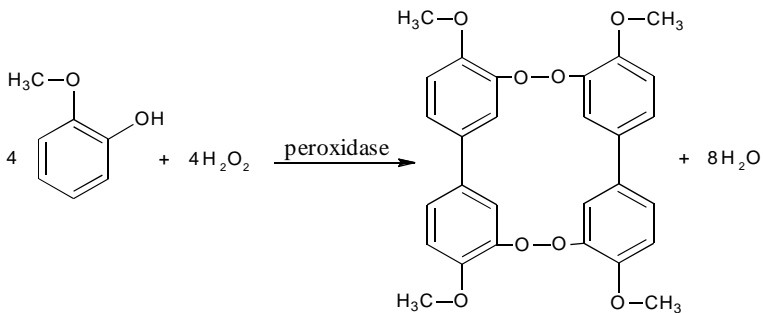


Figura 15 - Reação entre guaiacol e peróxido de hidrogênio, catalisada pela peroxidase.

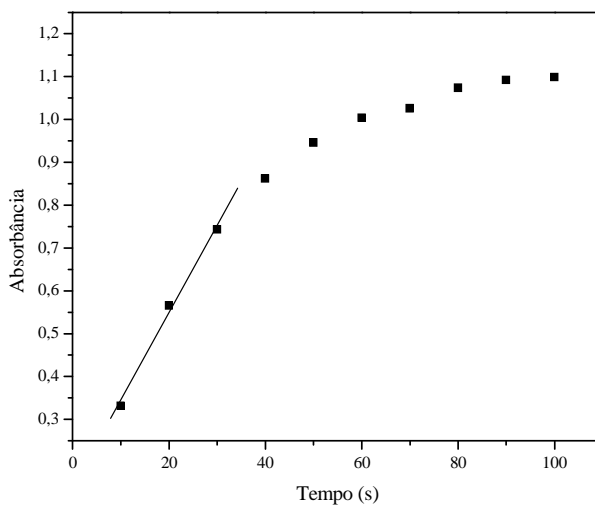


Figura 16 – Determinação da atividade da peroxidase.

$$\text{Atividade} = \frac{\Delta \text{Abs} \times 1000}{\Delta t \times V}$$

Equação (1)

Onde:

Atividade da enzima = unidades mL^{-1}

ΔAbs = Variação da absorbância (470 nm)

V = Volume do extrato (mL)

Δt = Variação do tempo (s)

$$\text{Atividade} = \frac{(0,743-0,332) \times 1000}{[(30-10)/60] \times 0,2}$$

$$\text{Atividade} = 6.227,27 \text{ unidades } \text{mL}^{-1}$$

2.4.2 Otimização da Construção do Eletrodo Au-SAM-Broto de Feijão.

Foi realizada uma avaliação do efeito da concentração das substâncias empregadas na construção do biossensor proposto. Assim, foi investigada a concentração de L-cisteína ($1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), a concentração de cianamida (0,12 a $1,12 \text{ mol L}^{-1}$), unidades de enzima (10,0 a 50,0 unidades mL^{-1}) e concentração do glutaraldeído (0,25 a 2,5%, v/v) para se obter a maior resposta analítica do biossensor. Para isso foram utilizadas soluções $1,30 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de dopamina e $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ peróxido de hidrogênio preparadas em solução tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} ; pH 7,0).

O efeito da concentração de L-cisteína na faixa de $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ mostrou que o maior pico de corrente foi observado usando um eletrodo modificado com $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de L-cisteína e, assim sendo, esta concentração foi usada nas demais construções dos eletrodos.

A cianamida foi utilizada para ligar a enzima ao grupo carboxílico da L-cisteína. Então, o efeito da concentração variando de 0,12 a $1,12 \text{ mol L}^{-1}$ sobre a resposta do eletrodo foi investigado. O eletrodo contendo 0,35 mol L^{-1} de cianamida apresentou maior resposta e foi usado na construção dos demais eletrodos.

O efeito da concentração da enzima de 10,0 a 50,0 unidades mL^{-1} sobre a resposta do biossensor foi também investigado. A maior resposta foi obtida em concentração de 30,0 unidades mL^{-1} , e, subsequentemente, esta concentração foi usada no estudo. A parte final da construção do biossensor foi a fixação da enzima, onde glutaraldeído foi usado como

reticulante. As soluções de glutaraldeído nas porcentagens de 0,25 a 2,5% (v/v) foram investigadas e o maior sinal analítico foi obtido com uma reticulação usando 2,5% (v/v) e esta concentração foi usada na construção dos eletrodos posteriores. A Tabela 1 mostra todos os parâmetros investigados e os valores ótimos encontrados na otimização da construção do eletrodo Au-SAM-broto de feijão.

Tabela 1 – Otimização da construção do eletrodo Au-SAM-broto de feijão

Parâmetro	Faixa estudada	Maior resposta
L-cisteína (mol L ⁻¹)	$1,0 \times 10^{-2} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-3}$
Cianamida (mol L ⁻¹)	0,12 – 1,12	0,35
Peroxidase (unidades mL ⁻¹)	10,0 – 50,0	30,0
Glutaraldeído (% , v/v)	0,25 – 2,50	2,50

2.4.3 Modificação da Superfície do Eletrodo de Ouro e Comportamento Eletroquímico da Dopamina.

Geralmente, em um biossensor, a taxa de transferência de elétrons é dependente da distância entre os centros redox que estão envolvidos no processo. Devido ao fato de que, em geral, o centro redox das enzimas encontra-se no interior da molécula da proteína, a distância para a transferência de elétrons é frequentemente considerável e, consequentemente, a velocidade desta transferência é lenta. Portanto, a fim de encurtar esta distância, uma orientação adequada da enzima sobre o eletrodo é necessária (GASPAR *et al.*, 2001). Na formação de SAM sobre a superfície de um eletrodo de ouro, uma cadeia alquila curta de um alcanotiol, geralmente não superior a três átomos de carbono, pode ser utilizada para fixar o centro redox da enzima, o mais próximo possível da base metálica e assim facilitar a transferência de elétrons (MENDES *et al.*, 2004). Desta forma, para a construção do biossensor baseado em peroxidase de broto de feijão foi utilizada SAM de L-cisteína. O grupo tiol da L-cisteína permitiu a montagem de uma monocamada sobre um eletrodo de ouro através da forte interação entre o enxofre e o ouro. Neste trabalho, o grupo carboxílico terminal da L-cisteína foi usado para imobilizar a peroxidase, devido a sua reatividade com certos grupos químicos desta biomolécula. Para imobilizar a

enzima covalentemente sobre a superfície do eletrodo Au-SAM, os grupos amino da peroxidase foram acoplados aos grupos ácidos ativados da L-cisteína, através da formação de amidas, utilizando uma solução de cianamida. Com o objetivo de se obter uma imobilização mais eficiente e tornar o ambiente mais propício para a atividade enzimática, foi utilizada a reação com glutaraldeído. Este reagente, através da formação de bases de Schiff forma ligações covalentes cruzadas na enzima através de seus grupos amino primários resultando em maior estabilidade e sensibilidade do biossensor (OLIVEIRA *et al.*, 2006). A Figura 17 mostra uma representação esquemática da formação das SAM e a imobilização da peroxidase covalentemente reticulada com glutaraldeído na superfície do biossensor.

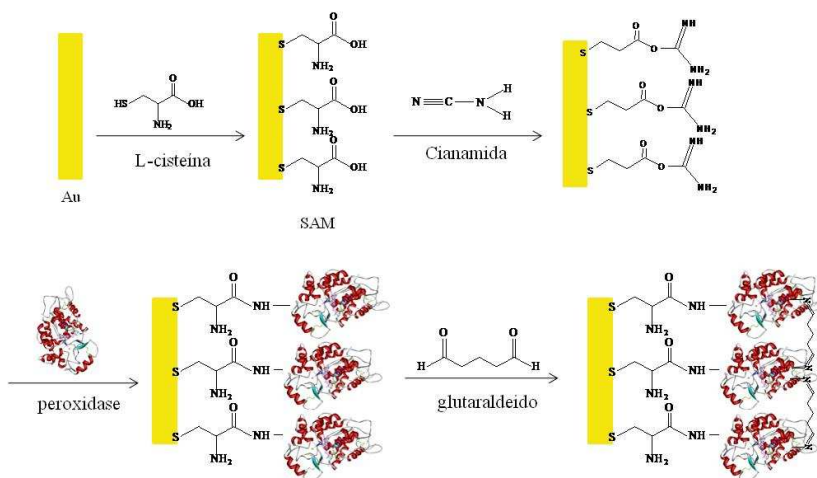


Figura 17 – Representação esquemática da formação do biossensor Au-SAM-broto de feijão.

O comportamento eletroquímico da dopamina usando o biossensor foi investigado por voltametria de onda quadrada em uma faixa de potencial de +0,7 a -0,5 V vs Ag/AgCl. A Figura 18 mostra os voltamogramas obtidos usando: (a) eletrodo de ouro e (b) eletrodo Au-SAM-broto de feijão em solução $9,74 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de dopamina e solução $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio em solução tampão

fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Foi observada uma maior resposta para o biossensor, referente à onda de redução da quinona para dopamina no potencial de $+0,15 \text{ V}$, comparada com a resposta do eletrodo de ouro.

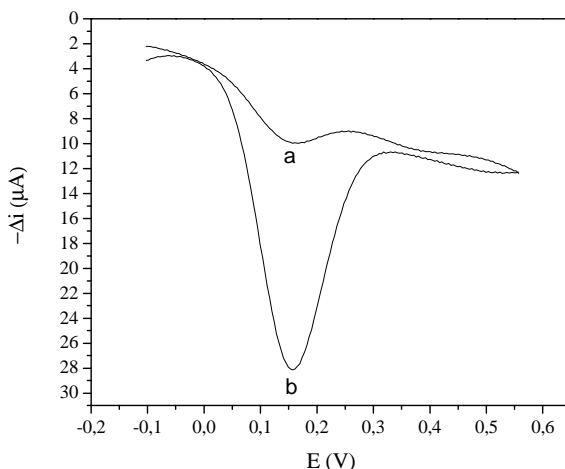


Figura 18 – Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de $9,74 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dopamina e $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0) para (a) eletrodo de ouro e (b) eletrodo Au-SAM-broto de feijão.

Esta maior resposta do biossensor em relação ao eletrodo de ouro é uma característica que pode ser atribuída à eficiente imobilização da enzima facilitando a transferência de elétrons na superfície do biossensor. Proteínas que são imobilizadas diretamente sobre a superfície metálica podem desnaturar. Além disso, a alta organização exibida pelas monocamadas garante um comportamento homogêneo sobre toda a superfície do eletrodo contribuindo para uma maior sensibilidade e reprodutibilidade (FREIRE *et al.*, 2003).

A Figura 19 mostra um esquema da reação enzimática entre o substrato e a enzima na superfície do biossensor. Inicialmente, a dopamina (A) na presença da peroxidase e do peróxido de hidrogênio, foi oxidada à dopaminaquinona (B). Em seguida, esta *o*-quinona foi reduzida eletroquimicamente na superfície do eletrodo no potencial de $+0,15 \text{ V vs Ag/AgCl}$.

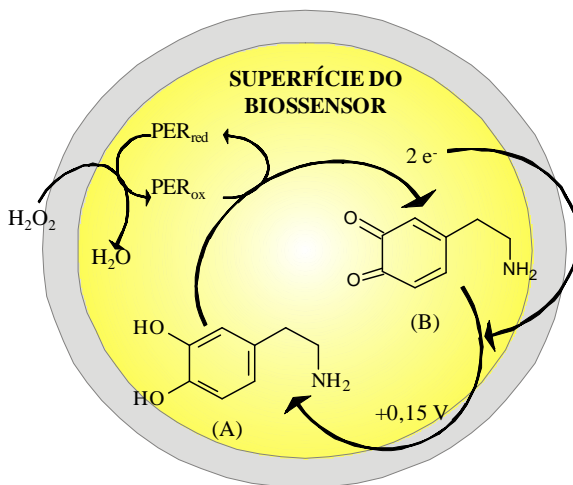


Figura 19 – Representação esquemática da oxidação/redução da dopamina

2.4.4 Otimização dos Parâmetros Experimentais.

Após a otimização da construção do biossensor outros parâmetros experimentais importantes foram investigados incluindo pH, concentração do peróxido de hidrogênio e os parâmetros da voltametria de onda quadrada (frequência, amplitude de pulso e incremento) para obter a melhor resposta para o eletrodo Au-SAM-broto de feijão proposto. Para a avaliação destes parâmetros foi utilizada uma solução $1,30 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de dopamina e $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio.

O pH exerce grande influência sobre as enzimas afetando diretamente nas reações enzimáticas. A influência deste parâmetro foi estudada na faixa de 5,0 a 8,0 (Figura 20). A maior resposta foi obtida em pH 6,0, diminuindo nos demais valores de pH. Consequentemente, este valor de pH foi selecionado para os estudos posteriores. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por outros pesquisadores usando a enzima peroxidase de raiz forte (RAZOLA *et al.*, 2002, LIU *et al.*, 2009).

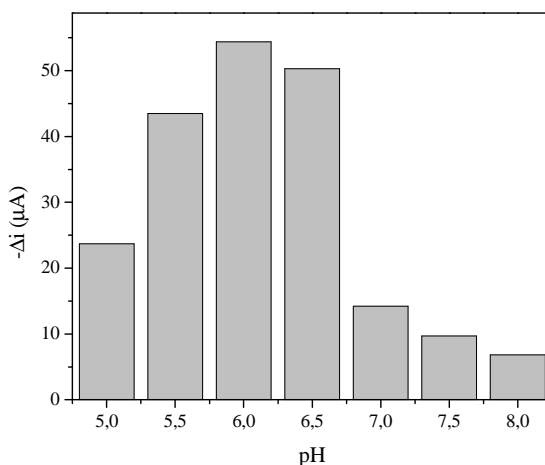


Figura 20 – Influência do pH sobre a resposta do biossensor.

Outro fator que pode influenciar a resposta do biossensor é a concentração de peróxido de hidrogênio que a peroxidase necessita para catalisar a reação. Deste modo, concentrações de $3,13 \times 10^{-5}$ a $8,06 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ foram investigadas usando solução $1,30 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de dopamina em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 6,0). A Figura 21 mostra que não houve diferença significativa nas respostas obtidas na faixa estudada e a concentração de $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ foi então selecionada.

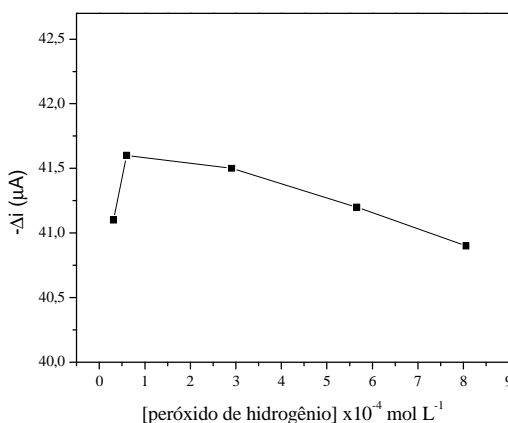


Figura 21 – Influência da concentração de peróxido de hidrogênio.

A avaliação dos parâmetros da voltametria de onda quadrada é de extrema importância para se obter uma maior resposta, pois influenciam na obtenção de picos relativamente estreitos oferecendo assim maior sensibilidade ao método. Portanto, a frequência, amplitude de pulso e incremento foram otimizados nas condições descritas abaixo.

Foram estudados os efeitos da frequência (10-120 Hz), amplitude de pulso (10-120 mV) e incremento (0,5-5,0 mV) sobre a resposta do biossensor. O maior sinal analítico para o parâmetro frequência foi obtido em 100 Hz e este foi selecionado para os procedimentos posteriores (Figura 22). O eletrodo mostrou linearidade até a amplitude do potencial de pulso de 80 mV (Figura 23) e este valor foi usado em todos os experimentos empregando o eletrodo proposto. Em adição, o parâmetro do incremento (Figura 24) foi estudado na faixa de 0,3 a 5,0 mV. Neste estudo, a maior resposta foi obtida com um incremento de 4,0 mV.

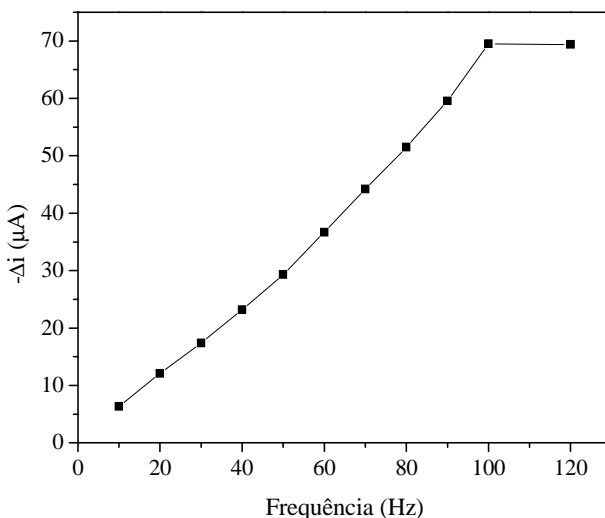


Figura 22 – Estudo da frequência sobre a resposta analítica do biossensor.

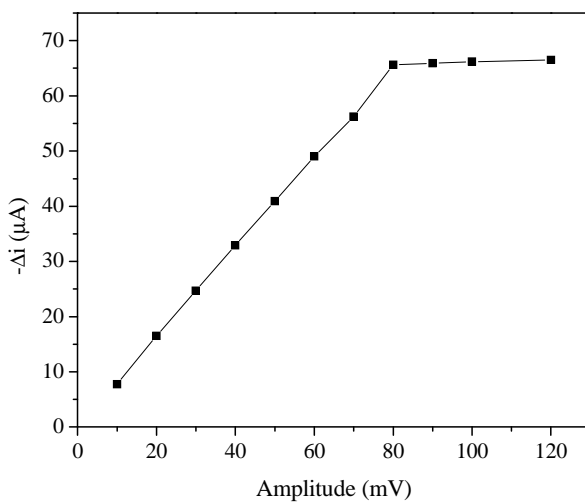


Figura 23 – Estudo da amplitude de pulso sobre a resposta analítica do biossensor.

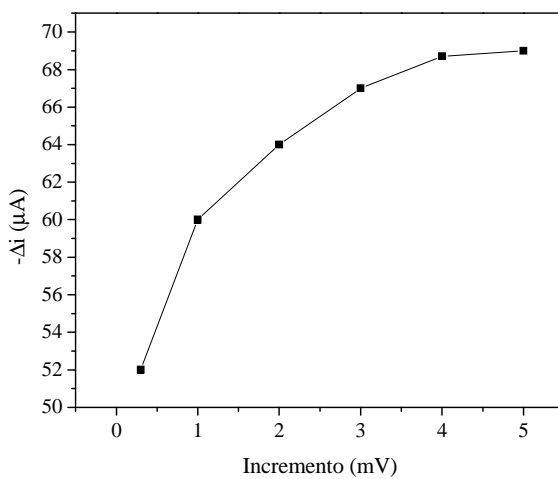


Figura 24 – Estudo do incremento sobre a resposta analítica do biossensor.

2.4.5 Repetibilidade, Reprodutibilidade e Estabilidade do Biossensor

Com a finalidade de investigar esses parâmetros foram utilizadas soluções contendo $1,30 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ dopamina e $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ peróxido de hidrogênio em solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 6,0) e sob as condições otimizadas descritas anteriormente. No estudo da repetibilidade foram efetuadas seis medidas sucessivas utilizando o mesmo biossensor. Os valores obtidos para as correntes de pico resultantes foram calculados e o desvio padrão relativo foi de 3,1%.

O estudo da reprodutibilidade foi realizado empregando quatro biossensores preparados independentemente. Uma reprodutibilidade aceitável foi obtida com um desvio padrão relativo de 10,5 %. A estabilidade do biossensor foi averiguada por um período de 20 dias, nos quais o sensor foi armazenado em temperatura ambiente. Não houve mudança significativa na resposta ($\geq 80\%$) durante quinze dias (em torno de 300 determinações).

2.4.6 Curva Analítica

A voltametria de onda quadrada é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis oferecendo uma maior sensibilidade da resposta eletroquímica e limite de detecção. Desta forma, o desempenho analítico e os voltamogramas (Figura 25A) do biossensor foram obtidos empregando esta técnica para a construção da curva analítica (Figura 25B) para dopamina. Sob as condições ótimas estabelecidas acima, a curva analítica obtida foi linear na faixa de $9,91 \times 10^{-6}$ a $2,21 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de dopamina ($-\Delta i = 1,036 + 1,65 \times 10^5$ [dopamina]; $r = 0,9998$), onde Δi é a corrente de pico em μA e [dopamina] é a concentração de dopamina em mol L⁻¹. O limite de detecção (3 x desvio padrão do intercepto/inclinação) e o limite de quantificação (10 x desvio padrão do intercepto/inclinação) encontrados foram $4,78 \times 10^{-7}$ e $1,60 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente.

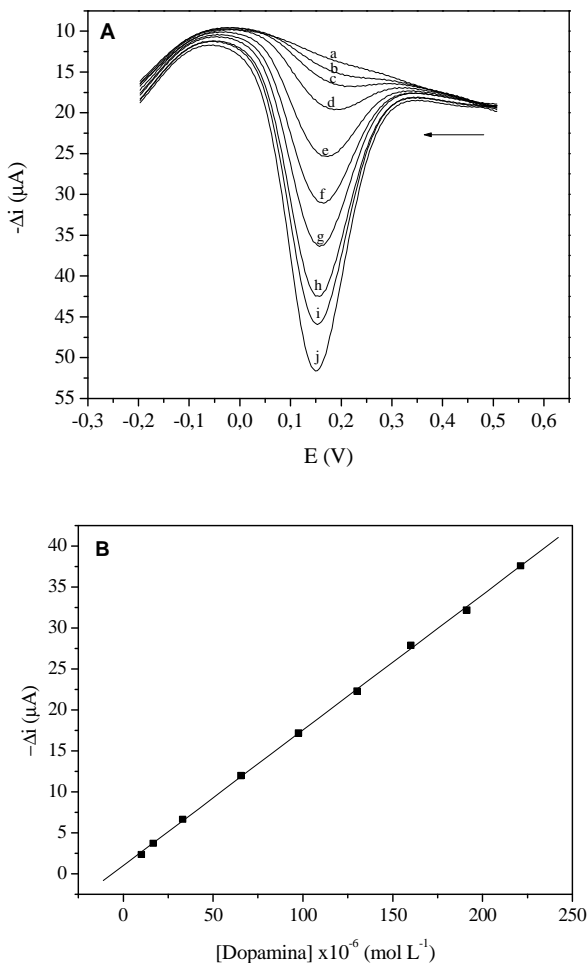


Figura 25 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o eletrodo Au-SAM-broto de feijão em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0) para (a) peróxido de hidrogênio $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e soluções de dopamina nas concentrações: (b) $9,91 \times 10^{-6}$; (c) $1,65 \times 10^{-5}$; (d) $3,29 \times 10^{-5}$; (e) $6,53 \times 10^{-5}$; (f) $9,74 \times 10^{-5}$; (g) $1,30 \times 10^{-4}$; (h) $1,60 \times 10^{-4}$; (i) $1,91 \times 10^{-4}$; (j) $2,21 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; em amplitude de pulso de 80 mV; frequência de 100 Hz e incremento de 4 mV. **(B)** Curva analítica da dopamina.

2.4.7 Estudo de Recuperação e Determinação de Dopamina

Um estudo de recuperação foi realizado em três amostras de formulações farmacêuticas. Foram adicionadas três alíquotas de soluções padrão de dopamina em concentrações diferentes (3,13, 6,24 e 9,33 mg mL⁻¹). Os resultados encontrados foram comparados com as concentrações adicionadas (Tabela 2) e mostram que a recuperação média variou de 98,0 a 111,8 %, demonstrando a exatidão do sensor proposto.

Tabela 2 – Resultados para recuperação da solução padrão de dopamina em formulações farmacêuticas usando o biossensor

Amostra	Dopamina (mg mL ⁻¹)		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado	
A	3,13	3,28±0,10	104,8
	6,24	6,16±0,20	98,7
	9,33	9,27±0,20	99,4
B	3,13	3,46±0,10	110,5
	6,24	6,41±0,10	102,7
	9,33	9,14±0,20	98,0
C	3,13	3,50±0,10	111,8
	6,24	6,65±0,20	106,6
	9,33	9,14±0,10	98,0

A fim de verificar a aplicabilidade do biossensor proposto, foi determinada a concentração de dopamina em três amostras farmacêuticas. Os resultados da análise usando este biossensor foram comparados com aqueles obtidos utilizando o método espectrofotométrico (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1977) e os valores rotulados. Como podem ser observados na Tabela 3, os resultados das análises estão de acordo com os valores esperados em um nível de confiança de 95 %. Assim, pode-se concluir que o novo procedimento é aceitável para esta aplicação.

Tabela 3 – Determinação de dopamina em fármacos usando o método espectrofotométrico e o biossensor

Amostra	Dopamina (mg mL ⁻¹)			Erro relativo (%)	
	Valor rotulado	Método espectrofotométrico	Biossensor	Er ₁ ^a	Er ₂ ^b
A	5,00	5,09±0,10	5,08±0,10	+1,6	-0,2
B	5,00	5,10±0,10	5,18±0,10	+3,6	+1,6
C	5,00	5,13±0,10	5,37±0,20	+7,4	+4,7

^aEr₁: biossensor vs valor rotulado; ^bEr₂: biossensor vs método espectrofotométrico.

Diversos sensores foram descritos na literatura (WANG *et al.*, 2001; LUPETTI *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2007; THIAGARAJAN *et al.*, 2007; TEMBE *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009; ENSAFI *et al.*, 2010; NOROOZIFAR *et al.*, 2010; JOSHI *et al.*, 2010) para a determinação de dopamina. As características analíticas desses sensores são apresentadas na Tabela 4, destacando, o eletrodo base usado, bem como os modificadores. Pode-se observar que além dos eletrodos metálicos podem ser utilizados outros tipos de eletrodos base para modificação, como a pasta de carbono ou carbono vítreo. Modificadores diversos (biológicos ou não) são utilizados na busca de sensores mais sensíveis e estáveis. A tabela lista também as faixas lineares e limites de detecção para dopamina. Pode-se observar que o limite de detecção do biossensor proposto é comparável ou maior que os demais relacionados, ficando atrás do eletrodo modificado com DNA, do que utilizou nanopartículas de ouro e do que usou o sulfonazo III.

O bom desempenho analítico e estabilidade do biossensor proposto podem ser atribuídos à forte, organizada e estável imobilização da peroxidase de broto de feijão sobre o eletrodo de ouro. Embora somente uma quantidade mínima de peroxidase tenha sido utilizada para a construção do biossensor, a atividade biológica é mantida devido ao microambiente favorável para imobilização desta enzima permitindo a realização de várias medidas.

Tabela 4 – Sensores para a determinação de dopamina

Modificador	Eletrodo	Faixa linear (mol L ⁻¹)	Limite de deteccção (mol L ⁻¹)	Referência
Penicilamina	Ouro	2,0x10 ⁻⁵ a 8,0x10 ⁻⁴	4,0x10 ⁻⁶	WANG, 2001
Peroxidase	Pasta de carbono	5,0x10 ⁻⁴ a 3,0x10 ⁻³	2,6x10 ⁻⁵	LUPETTI, 2005
DNA	Carbono vítreo	1,9x10 ⁻⁷ a 13x10 ⁻⁶	8,8x10 ⁻⁸	LIN, 2007
Nano-Au e Pt	Carbono vítreo	1,0x10 ⁻⁴ a 1,6 x10 ⁻³	—	THIAGARAJAN, 2007
Tirosinase	Carbono vítreo	5,0x10 ⁻⁵ a 2,5x10 ⁻⁴	2,5x10 ⁻⁵	TEMBE, 2008
Nano-Au	Carbono vítreo	1,0x10 ⁻⁸ a 2,5x10 ⁻⁵	4,0x10 ⁻⁹	HU, 2008
ACB K	Carbono vítreo	1,0x10 ⁻⁶ a 2,0x10 ⁻⁴	5,0x10 ⁻⁷	ZHANG, 2009
Sulfonazo III	Carbono vítreo	5,0x10 ⁻⁸ a 4,7x10 ⁻⁴	3,0x10 ⁻⁸	ENSAFI, 2010
Nano- Ag[Fe(CN) ₆]	Carbono vítreo	2,4x10 ⁻⁶ a 1,3x10 ⁻⁴	1,4x10 ⁻⁷	NOROOZIFAR, 2010
Monoamina oxidase	Carbono vítreo	5,0x10 ⁻⁵ a 2,5x10 ⁻⁴	2,0x10 ⁻⁵	JOSHI, 2010
Peroxidase	Ouro	9,9x10 ⁻⁶ a 2,2x10 ⁻⁴	4,78x10 ⁻⁷	ESTE TRABALHO

CAPÍTULO 2 BIOSSENSOR CONTENDO PEROXIDASE IMOBILIZADA EM MONOCAMADA AUTO-ORGANIZADA DE L-CISTEÍNA PARA DETERMINAÇÃO DE TIODICARBE

3.1 RESUMO

Neste trabalho, foi construído um biossensor contendo extrato de broto de alfafa (*Medicago sativa*), fonte da enzima peroxidase para a determinação de tiodicarbe em maçã, morango e batata. A voltametria de onda quadrada foi usada nos estudos de otimização do biossensor e na determinação desse composto. O extrato enzimático foi imobilizado em SAM de L-cisteína sobre eletrodo de ouro. Diversos parâmetros foram investigados para avaliar as melhores condições experimentais do biossensor. A curva analítica foi linear para tiodicarbe nas concentrações de $2,27 \times 10^{-6}$ a $4,40 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $5,75 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e limite de quantificação de $1,92 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. O tempo de vida do sensor foi de 20 dias (220 determinações). A média da recuperação de tiodicarbe nas amostras variou de 99,02 a 101,04 %. Os resultados obtidos para o analito nas amostras usando o método proposto estão de acordo com aqueles usando o procedimento de cromatografia líquida de alta eficiência em um nível de 95 % de confiança.

3.2 INTRODUÇÃO

Diversos compostos orgânicos tóxicos (herbicidas, acaricidas, fungicidas e inseticidas) têm sido usados na agricultura para controle de doenças e obter uma alta produção. Resíduos destes pesticidas podem entrar na cadeia alimentar através do ar, da água e do solo e causar numerosos problemas para os ecossistemas e os seres humanos. Eles podem produzir doenças na medula óssea, infertilidade, perturbações nervosas e doenças imunológicas e respiratórias (HUANGXIAN *et al.*, 2008). Portanto, a presença de resíduos de pesticidas em águas naturais e em alimentos é uma das maiores razões de preocupação da saúde pública (PEDROSA *et al.*, 2008).

Carbamatos são compostos utilizados como pesticidas em larga escala, em todo o mundo, devido sua atividade biológica muito abrangente. Estes pesticidas incluem um vasto espectro de inseticidas amplamente usados como acaricidas, nematocidas e helmintocidas (MICKOVA *et al.*, 2005; KRALJ *et al.*, 2007). Pessoas envolvidas na fabricação ou na aplicação de carbamatos podem estar expostas a estes agrotóxicos no local de trabalho ou no meio ambiente em geral (LI *et al.*, 2004). Vários compostos carbamatos são altamente tóxicos para humanos e outros mamíferos. Estes compostos atuam inibindo as enzimas colinesterases, especialmente a acetilcolinesterase, levando a um acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas, provocando uma série de efeitos parassimpatomiméticos. Estes pesticidas são inibidores reversíveis das colinesterases, mas o envenenamento pode ser muito grave (SMULDERS *et al.*, 2003).

Tiodicarbe, 3,7,9,13-tetrametil-5,11-dioxa-2,8,14-tritia-4,7,9,12-azapentadeca-3,12-dieno-6,10-diona (Figura 26) é um pesticida carbamato com um espectro relativamente estreito de atividade, estando intimamente relacionado com o seu primeiro metabólito, o metomil. Ele age contra lesmas, bem como os lepidópteros, controlando as larvas em diferentes fases, assim como os ovos, em muitos casos. É neurotóxico através da inibição da colinesterase causando paralisia seguida de morte. Este pesticida é usado no tratamento de sementes e para o controle de várias pragas nas culturas de algodão, soja, tomate, amendoim, milho e legumes, entre outras (HOIZEY *et al.*, 2008).

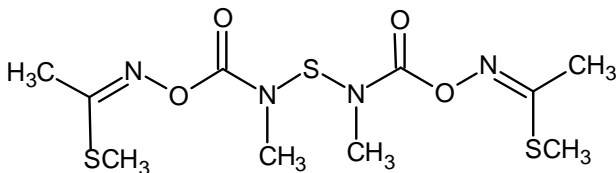


Figura 26 - Fórmula estrutural do tiodicarbe.

Os métodos analíticos que são mais comumente empregados na determinação de pesticidas são a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG) com diferentes detectores (WAN e HARRINGTON, 2000; WANG *et al.*, 2009; CUS *et al.*, 2010). Estes métodos geralmente requerem homogeneização, extração, concentração e determinação analítica, sendo estes procedimentos muitas vezes morosos. Os biossensores são alternativas para determinar pesticidas em matrizes alimentares e ambientais (HILDEBRANDT *et al.*, 2008) e tem a vantagem do baixo custo, sensibilidade, fácil operação e possibilidade para a construção de dispositivos portáteis simples para um rastreamento rápido (MORAES *et al.*, 2009). Biossensores enzimáticos são aplicados usando o efeito inibidor dos compostos nocivos sobre a atividade das enzimas (NUNES *et al.*, 1999). A capacidade para detectar estes compostos tóxicos através da sua ação inibidora sobre as enzimas esterases resultou no desenvolvimento de muitos biossensores baseados nestas proteínas (ANDREESCU e MARTY, 2006; DU *et al.*, 2007). Biossensores baseados na inibição de enzimas oxidorreduções (tirosinase e peroxidase) pelos pesticidas carbamatos (WANG *et al.*, 1993; BESOMBES *et al.*, 1995; ALBUQUERQUE e FERREIRA, 2007) também tem sido descritos, sendo que a presença desses compostos inibidores causam uma constante diminuição na corrente de resposta do biossensor.

Neste trabalho, extrato de broto de alfafa (*Medicago sativa*) foi usado como fonte da enzima peroxidase. Quando um inibidor é introduzido no meio reacional, ele pode coordenar-se com o composto I intermediário da peroxidase, resultando em um decréscimo na atividade enzimática e consequente diminuição da resposta da corrente (MARQUES e YAMANAKA, 2008). Diversos compostos orgânicos e inorgânicos, tais como metais, ácido *p*-aminobenzóico, cisteína, glutatona, hidroxilamina, sulfetos, tiouracilas, dicromato, tióis, dietilditiocarbamatos e cianeto tem sido descritos por inibir a ação da peroxidase (WANG *et al.*, 1993; YANG *et al.*, 2004; KEYHANI *et al.*, 2005; SARIRI *et al.*, 2006).

Existem poucos trabalhos que empregam bioeletrodos para a determinação de pesticidas em amostras reais. Por este motivo, neste trabalho foi desenvolvido um biossensor baseado em Au-SAM-broto de alfafa para determinação de tiodicarbe em maçã, morango e batata. Este composto tóxico pode ser determinado a partir do seu efeito inibidor sobre a atividade da peroxidase. Por último, os resultados obtidos com o método bioeletroanalítico proposto foram comparados com os obtidos com o método HPLC para análise de tiodicarbe.

3.3 PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 Reagentes e Soluções

Dopamina, epinefrina, ácido cafeico, hidroquinona, metildopa e tiodicarbe foram procedentes da Sigma. Brotos de alfafa, maçã, morango, e batata foram comprados em supermercado de Florianópolis.

As soluções de tampão fosfato (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0) e as soluções de cianamida, L-cisteína, glutaraldeído, guaiacol, peróxido de hidrogênio e solução piranha foram preparadas conforme os métodos descritos para o preparo destas soluções no capítulo 2.

A solução $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de hidroquinona foi obtida dissolvendo-se 22,0 mg desta substância em um balão volumétrico de 10,0 mL e completando-se o volume com solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0).

A solução $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de dopamina foi obtida dissolvendo-se 37,9 mg desta substância em um balão volumétrico de 10,0 mL e completando-se o volume com solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0).

A solução $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de epinefrina foi obtida dissolvendo-se 36,6 mg desta substância em um balão volumétrico de 10,0 mL e completando-se o volume com solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0).

A solução $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de metildopa foi obtida dissolvendo-se 47,6 mg desta substância em um balão volumétrico de 10,0 mL e completando-se o volume com solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0).

A solução $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de ácido cafeico foi obtida dissolvendo-se 36,0 mg desta substância em um balão volumétrico de 10,0 mL e completando-se o volume com solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0).

A solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de tiodicarbe foi obtida dissolvendo-se 8,8 mg desta substância com 10 mL de álcool etílico em um balão volumétrico de 25,0 mL e completando-se o volume com água deionizada.

3.3.2 Instrumentação

Os equipamentos utilizados na realização deste trabalho foram os mesmos descritos no capítulo 2, com exceção do equipamento usado no método comparativo. Neste trabalho, a análise comparativa do método analítico proposto foi realizada em um sistema cromatográfico (HPLC) consistindo de um cromatógrafo Varian Pro Star com uma bomba ternária Pro Star 210 e um detector Pro Star 325 UV-vis. Este equipamento foi empregado juntamente com uma coluna cromatográfica de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) (Varian).

3.3.2.1 Medidas Voltamétricas

Os experimentos de voltametria de onda quadrada foram realizados no mesmo potenciostato/galvanostato descrito no capítulo anterior. Foi utilizado um mesmo sistema convencional de três eletrodos, no qual, foi utilizado como eletrodo de trabalho o biossensor com enzima peroxidase de broto de alfafa (Au-SAM-broto de alfafa).

3.3.3 Preparação do Eletrodo Au-SAM-broto de Alfafa

Para construir o biossensor, o extrato enzimático do broto de alfafa foi obtido e a atividade de peroxidase determinada conforme os procedimentos descritos previamente no capítulo 2 (VIEIRA e FATIBELLO-FILHO, 1998; VIEIRA *et al.*, 1999).

Antes da deposição da SAM sobre o eletrodo de ouro, este foi submetido a um procedimento de limpeza adaptado de Carvalhal *et al.*, 2005, como relatado em detalhes no capítulo anterior. Após a limpeza, o substrato de ouro foi submetido aos mesmos procedimentos de montagem descritos para o biossensor de broto de feijão sendo que, neste trabalho, foram utilizadas $60,0$ unidades mL⁻¹ de peroxidase.

3.3.4 Preparação das Amostras e Análise do Tiodicarbe

Para determinar o teor de tiodicarbe nas amostras de maçã, batata e morango, uma massa de 20 g de cada vegetal picado foi submetida a

um processo de extração com 50 mL de etanol e as misturas foram mecanicamente maceradas por 5 min em um almofariz com pistilo. Os extratos foram filtrados através de um funil de Buchner e kitassato acoplado a uma bomba de vácuo, coletados em frasco âmbar e armazenados a 4°C. A determinação do tiodicarbe nas amostras foi realizada empregando o método de adição de padrão: uma alíquota de 20 µL de cada amostra foi transferida para uma cela de vidro contendo 5 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 e $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ peróxido de hidrogênio. As medições foram realizadas para cada amostra e após sucessivas adições de solução padrão de tiodicarbe. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. Os voltamogramas de onda quadrada foram registrados através da aplicação de um potencial de +0,2 a -0,4 V vs Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), após um tempo de agitação inicial de 60 s a fim de homogeneizar a solução.

3.3.5 Método Comparativo

Para a análise das amostras de maçã, batata e morango por HPLC, foi utilizado um volume de injeção de 20 µL. Como fase móvel foi usado um sistema isocrático água/acetonitrila (65:35, v/v) e a eluição do carbamato foi monitorada em 220 nm. A velocidade de fluxo foi de 1,0 mL min⁻¹ e o tempo requerido para análise de uma amostra foi de 18 min (J. AOAC, 2002). Este método comparativo foi realizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, sob a orientação do Prof. Dr. Valdir Souza Ferreira.

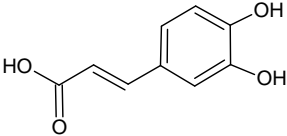
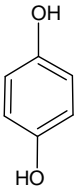
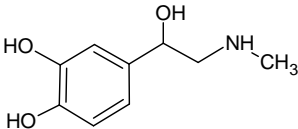
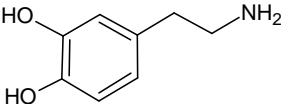
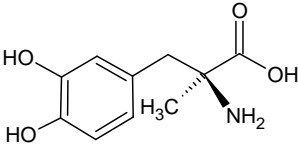
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Estudo dos Compostos Fenólicos

Para investigar a afinidade da peroxidase de broto de alfafa para diferentes substratos, foram selecionados e avaliados os seguintes compostos fenólicos: ácido cafeico, dopamina, epinefrina, hidroquinona e metildopa. As respostas do biossensor para estes substratos foram obtidas em uma concentração de $1,53 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0). A Tabela 5 apresenta uma comparação das respostas relativas (%) obtidas. Como pode ser observado, o biossensor proposto demonstrou diminuição da sensibilidade na seguinte ordem: ácido cafeico (100%), hidroquinona (77%), epinefrina (67%), dopamina (44%) e metildopa (11%). Neste estudo, a hidroquinona foi selecionada para a otimização do biossensor devido aos efeitos de adsorção do ácido

cafeico na superfície do sensor. Além disso, o efeito inibitório do tiodicarbo sobre a resposta do biossensor, foi investigado usando a hidroquinona como substrato. A corrente resultante estacionária, obtida da *o*-quinona reduzida eletroquimicamente na superfície do sensor, foi usada como um pico base, para medir o efeito de inibição do pesticida.

Tabela 5 – Resposta relativa do biossensor para os compostos fenólicos investigados

Composto fenólico	Estrutura	Resposta relativa (%)
Ácido cafeico		100
Hidroquinona		77
Epinefrina		67
Dopamina		44
Metildopa		11

3.4.2 Otimização dos parâmetros experimentais

A voltametria de onda quadrada foi usada para a otimização e avaliação do desempenho eletrocatalítico do biossensor. Inicialmente, a influência do pH foi estudada na faixa de 6,0 a 8,0 usando soluções $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de hidroquinona e $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ peróxido de hidrogênio como mostrado na Figura 27. A maior resposta para o analito foi obtida em pH 7,0, mostrando similaridade com resultados informados em outros estudos com biossensores contendo a enzima peroxidase obtida de vegetais (OLIVEIRA *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2007). Assim, a solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, em pH 7,0, foi usada como eletrólito suporte nas experiências seguintes.

Em seguida, o efeito da concentração da enzima (20,0 a 80,0 unidades mL⁻¹) foi investigado. As melhores respostas analíticas dos biossensores foram obtidas em uma composição de peroxidase equivalente a 60,0 unidades mL⁻¹, decrescendo em uma quantidade maior de enzima, conforme observado na Figura 28. Portanto, esta concentração de peroxidase foi usada na construção dos demais biossensores.

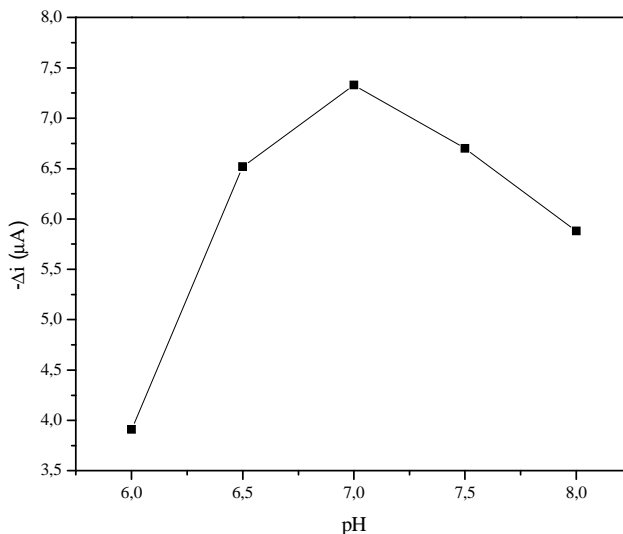


Figura 27 – Estudo de pH sobre a resposta do biossensor.

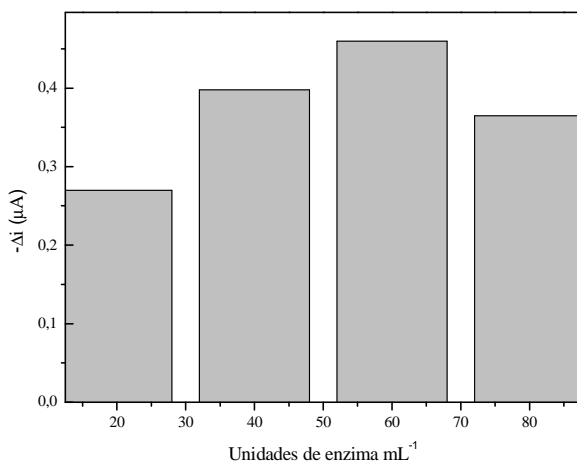


Figura 28 – Estudo da concentração da enzima no biossensor.

Para obter as melhores condições de trabalho experimentais para o biossensor, os parâmetros de voltametria de onda quadrada (frequência de 10 a 100 Hz; amplitude de pulso de 10 a 100 mV e incremento de 3 a 12,5 mV) foram investigados. Estes parâmetros foram estudados em relação à resposta do biossensor para uma solução $6,37 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona e $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ peróxido de hidrogênio em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

A Figura 29 mostra o melhor perfil da resposta do biossensor para o parâmetro frequência foi obtida em 30 Hz. Consequentemente, este valor de frequência foi selecionado para os estudos subsequentes.

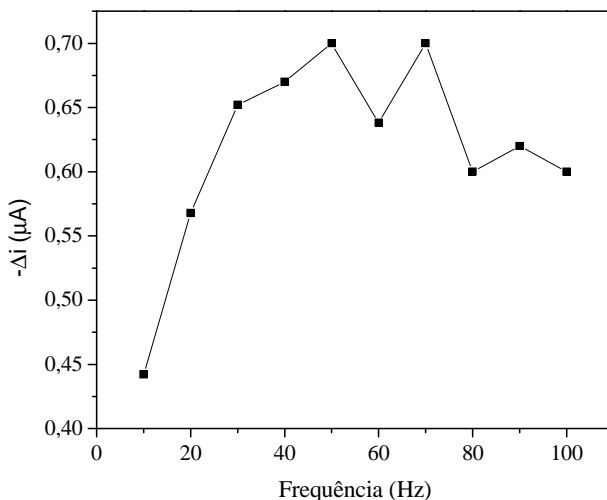


Figura 29 – Estudo da frequência sobre a resposta analítica do biossensor.

A amplitude do potencial de pulso foi investigada em um intervalo de 10 a 100 mV. De acordo com os resultados mostrados na Figura 30, houve um crescimento linear da intensidade da corrente até 100 mV. Desta forma, este valor de amplitude foi escolhido para o desenvolvimento deste trabalho.

Além disso, um estudo do incremento também foi realizado no intervalo de 3 a 12,5 mV. Conforme mostra a Figura 31, o maior sinal analítico obtido foi em 12,5 mV. As melhores condições experimentais foram selecionadas e aplicadas nos estudos posteriores.

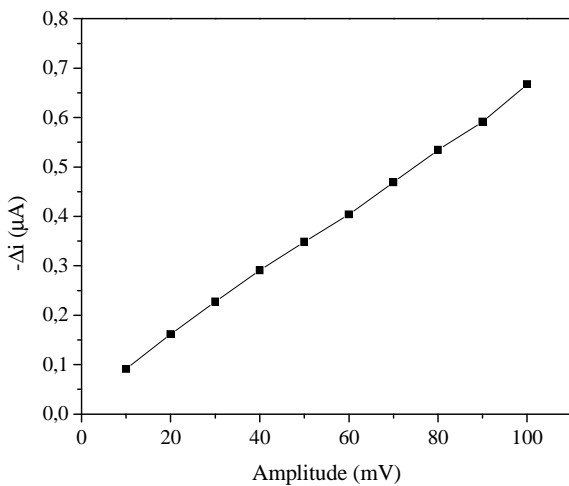


Figura 30 – Estudo da amplitude de pulso sobre a resposta analítica do biossensor.

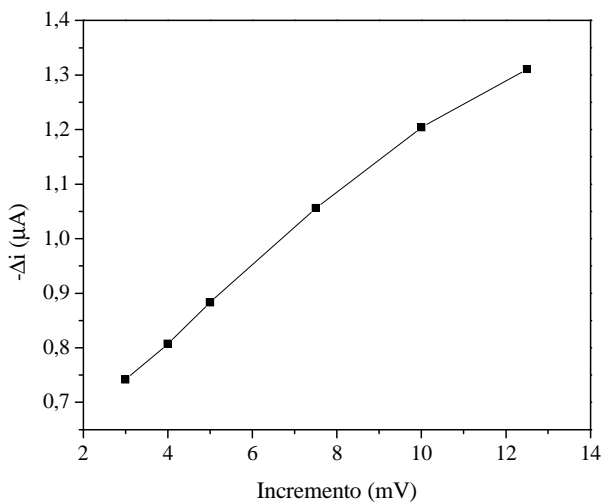


Figura 31 – Estudo do incremento sobre a resposta analítica do biossensor.

3.4.3 Repetibilidade, Reprodutibilidade e Estabilidade do Biossensor

A repetibilidade da resposta obtida com o mesmo biossensor foi examinada em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0) contendo solução $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona e solução $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. O desvio padrão relativo foi de 1,76% para dez medidas sucessivas, indicando que o biossensor tem um bom nível de repetibilidade.

Foram construídos cinco eletrodos Au-SAM-broto de alfafa usando o mesmo procedimento e foram utilizados de forma independente para a determinação de hidroquinona sob as condições otimizadas descritas previamente. Todos os biossensores apresentaram uma reprodutibilidade aceitável com um desvio padrão relativo de aproximadamente 7,60%, indicando que os resultados obtidos apresentam uma reprodutibilidade adequada.

A estabilidade e tempo de vida do biossensor foram investigados durante 30 dias, período pelo qual o biossensor foi mantido em temperatura ambiente. A corrente de resposta foi obtida com uma solução $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona e $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ peróxido de hidrogênio em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0). O eletrodo Au-SAM-broto de alfafa foi estável por 20 dias (220 determinações) sem uma mudança significativa na resposta ($\geq 80\%$).

3.4.4 Curvas Analíticas da Hidroquinona e Tiodicarbe

Após estabelecer as condições ótimas para a determinação de hidroquinona, foi construída uma curva analítica empregando voltametria de onda quadrada e o eletrodo Au-SAM-broto de alfafa na faixa de potencial de $+0,12$ a $-0,38 \text{ V vs Ag/AgCl}$. Um baixo potencial de trabalho impede a oxidação de possíveis interferentes presentes que podem oxidar em potenciais mais positivos. A curva analítica obtida para hidroquinona foi linear na faixa de $9,75 \times 10^{-5}$ a $1,28 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($-\Delta i = 0,26 (\pm 0,02) + 2,48 (\pm 0,05) \times 10^3 [\text{hidroquinona}]$; $r = 0,9986$), onde Δi é o pico de corrente resultante em μA e $[\text{hidroquinona}]$ a concentração de hidroquinona em mol L^{-1} . A Figura 32 demonstra uma representação esquemática da reação entre hidroquinona e a superfície do biossensor que contém peroxidase imobilizada. Inicialmente, a hidroquinona (a) foi oxidada pela peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio para *p*-benzoquinona (b) e este produto foi então reduzido eletroquimicamente em um potencial de $-0,072 \text{ V}$.

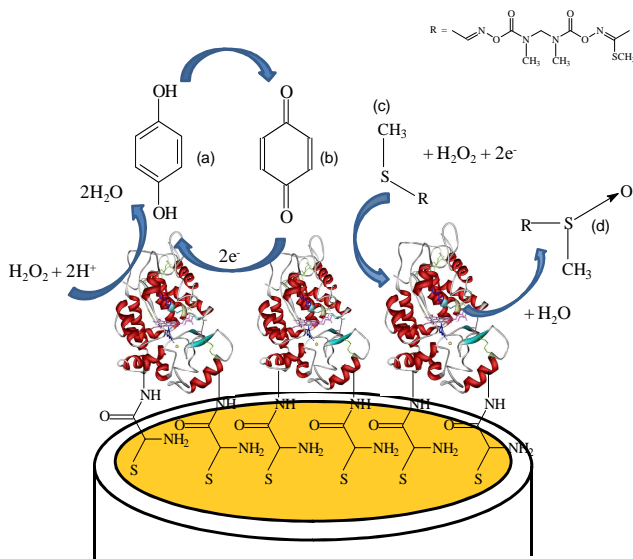


Figura 32 – Representação esquemática da reação envolvendo hidroquinona sobre a superfície do biossensor e a reação entre peroxidase e tiodicarbe. (a) hidroquinona, (b) *p*-benzoquinona, (c) tiodicarbe e (d) composto sulfóxido.

O tiodicarbe, quando adicionado ao meio onde ocorre este processo enzimático, proporciona uma diminuição na corrente produzida pela hidroquinona. Esta diminuição na corrente foi também observada na determinação de sulfetos e carbamato usando biossensores baseados na inibição de peroxidase e tirosinase (YANG *et al.*, 2004; ALBUQUERQUE e FERREIRA, 2007). Consequentemente, quando o tiodicarbe foi adicionado a uma solução de hidroquinona, foi observada uma diminuição na corrente de pico que é proporcional ao aumento da concentração do pesticida, demonstrando seu efeito inibidor sobre a reação. Estudos mostram que compostos que contêm enxofre, podem inibir a atividade da enzima através de interação com um sítio alostérico de ligação no ambiente heme da peroxidase, alterando sua estrutura (ZATÓN e ASPURO, 1995). Por outro lado, como descrito previamente, a peroxidase pode também catalisar a transferência de oxigênio do peróxido de hidrogênio (sulfoxidação e epoxidação, por exemplo). Assim sendo, esses resultados sugerem que pode haver também uma reação de sulfoxidação entre a enzima e o tiodicarbe. A Figura 32 também apresenta uma representação esquemática da possível

reação entre a peroxidase e o tiodicarbe. Quando o tiodicarbe (c) foi adicionado, a peroxidase pode ter catalisado a sulfoxidação do tiodicarbe com uma transferência de elétron inicial do substrato para o composto I seguido pela transferência do átomo de oxigênio da espécie reduzida do composto I, o chamado composto II, para produzir o sulfóxido (d) (GOTO *et al.*, 1999).

Assim sendo, foi investigada a influência da concentração de hidroquinona ($1,96 \times 10^{-4}$, $5,77 \times 10^{-4}$ e $1,12 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) sobre a linearidade das curvas analíticas do tiodicarbe e os resultados são apresentados na Tabela 6. A melhor faixa linear e coeficiente de correlação foram observados para a menor concentração de hidroquinona. Portanto, a concentração de hidroquinona de $1,96 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ foi usada neste estudo.

Tabela 6 – Resposta relativa do biossensor para os compostos fenólicos investigados

[hidroquinona] mol L ⁻¹	Linearidade mol L ⁻¹	Equação (Δi (mA) = A-B[tio] ^a)	Coeficiente de correlação (r)
$1,96 \times 10^{-4}$	$2,27 \times 10^{-6}$ – $4,40 \times 10^{-5}$	$\Delta i = 0,5602 -$ $6,3376 \times 10^3$ [tio]	0,9997
$5,77 \times 10^{-4}$	$4,37 \times 10^{-6}$ – $5,78 \times 10^{-5}$	$\Delta i = 1,3072 -$ $1,1533 \times 10^4$ [tio]	0,9995
$1,12 \times 10^{-3}$	$1,85 \times 10^{-5}$ – $8,20 \times 10^{-5}$	$\Delta i = 2,3700 -$ $2,0239 \times 10^4$ [tio]	0,9995

^a [tio]: Tiodicarbe

Os voltamogramas de onda quadrada e a curva analítica para tiodicarbe foram obtidos empregando o biossensor. A Figura 33A apresenta os voltamogramas obtidos com o biossensor em (a) solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e (b) hidroquinona $1,96 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, os demais voltamogramas correspondem às adições crescentes de tiodicarbe. Como mostra a Figura 32B, a curva analítica obtida para tiodicarbe foi linear para concentrações de $2,27 \times 10^{-6}$ a $4,40 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ ($-\Delta i = 0,56 (\pm 0,001) - 6,33 (\pm 0,05) \times 10^3$ [tiodicarbe]; $r = 0,9997$) onde Δi corresponde ao pico de corrente resultante em μA e [tiodicarbe] a concentração de tiodicarbe em mol L⁻¹, com limite de detecção de $5,75 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e limite de quantificação de $1,92 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

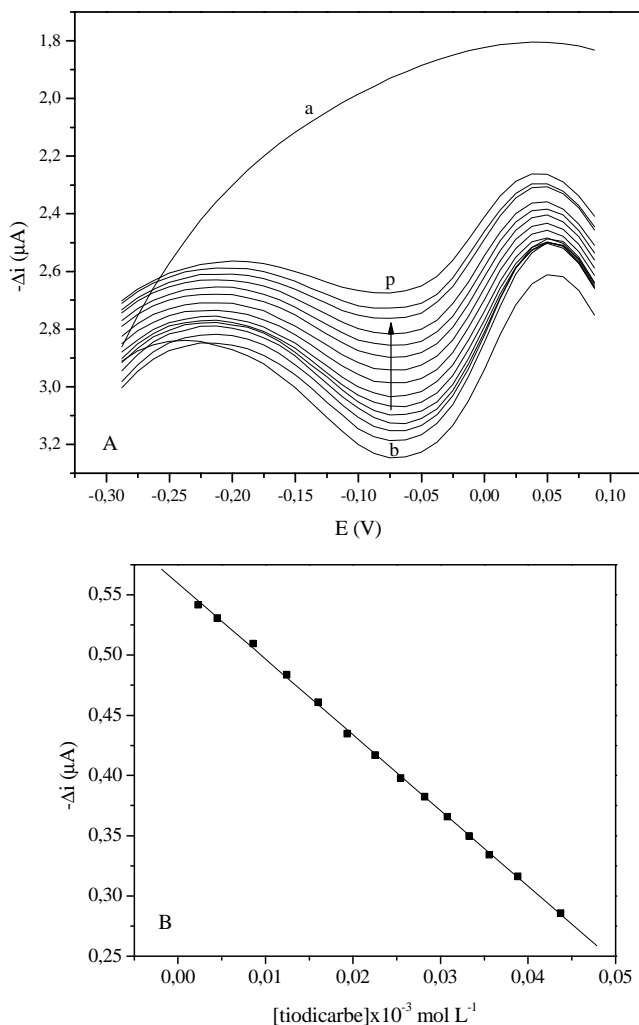


Figura 33 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor em (a) solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), (b) hidroquinona $1,96 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e adições de tiodicarbe (c) $2,26 \times 10^{-6}$, (d) $4,45 \times 10^{-6}$, (e) $8,58 \times 10^{-6}$, (f) $1,24 \times 10^{-5}$, (g) $1,60 \times 10^{-5}$, (h) $1,93 \times 10^{-5}$, (i) $2,24 \times 10^{-5}$, (j) $2,54 \times 10^{-5}$, (k) $2,81 \times 10^{-5}$, (l) $3,08 \times 10^{-5}$, (m) $3,32 \times 10^{-5}$, (n) $3,55 \times 10^{-5}$, (o) $3,88 \times 10^{-5}$ e (p) $4,37 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. (B) Curva analítica correspondente ao tiodicarbe.

A Tabela 7 apresenta biossensores baseados em enzimas oxidorreduzíveis (tirosinase, lacase e peroxidase), desenvolvidos por diversos pesquisadores, para a determinação de uma variedade de analitos através de métodos de inibição (PITA *et al.*, 1997; VIEIRA e FATIBELLO-FILHO, 1999; FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2000; YANG *et al.*, 2004; SEZGINTÜRK *et al.*, 2005; SANTHIAGO e VIEIRA, 2007; YANG *et al.*, 2008; ASAV *et al.*, 2009). Alguns desses biossensores foram propostos como uma alternativa de dispositivos para a detecção de pesticidas. Além disso, o uso de enzimas redox tem a vantagem da aplicação de um baixo potencial em relação ao eletrodo de referência minimizando interferências (MELLO *et al.*, 2003).

Tabela 7 – Biossensores contendo oxidorreduzíveis para determinação de analitos pelo processo de inibição

Enzima	Analito	Faixa linear (mol L ⁻¹)	Limite de detecção (mol L ⁻¹)	Referência
Tirosinase	Ziram	0,2x10 ⁻⁶ a 2,2x10 ⁻⁶	7,4x10 ⁻⁸	PITA, 1997
	Diram	4,0x10 ⁻⁶ a 44x10 ⁻⁶	1,3 x10 ⁻⁶	
	Dietilditio- carbamato	4,0x10 ⁻⁶ a 40x10 ⁻⁶	1,7 x10 ⁻⁶	
Tirosinase	L-cisteína	6,0x10 ⁻⁵ a 8,0x10 ⁻⁴	4,4x10 ⁻⁶	VIEIRA, 1999
Tirosinase	Fluoreto	1x10 ⁻⁶ a 20x10 ⁻⁶	-	ASAV, 2009
Polifenol oxidase	Ácido benzóico	25x10 ⁻⁶ a 100x10 ⁻⁶	2,5x10 ⁻⁵	SEZGINTÜRK, 2005
Peroxidase	Ácido ascórbico	2,0x10 ⁻⁴ a 5,5x10 ⁻³	2,2x10 ⁻⁵	FATIBELLO- FILHO, 2000
Peroxidase	Sulfetos	0,5x10 ⁻⁶ a 12,7x10 ⁻⁶	3,0x10 ⁻⁷	YANG, 2004
Peroxidase	Fenilhi-drazina	2,5x10 ⁻⁷ a 1,1x10 ⁻⁶	8,2x10 ⁻⁸	YANG, 2008
Lacase	L-cisteína	4,99x10 ⁻⁵ a 4,54x10 ⁻³	-	SANTHIAGO, 2007
Peroxidase	Tiodicarbe	2,27x10 ⁻⁶ a 4,40x10 ⁻⁵	5,75x10 ⁻⁷	ESTE ESTUDO

3.4.5 Estudo de Recuperação e Determinação do Tiodicarbe

O estudo de recuperação foi efetuado em triplicata, usando amostras de maçã, batata e morango. Os experimentos foram realizados pelo método de adição de padrão. Os resultados obtidos foram comparados com as concentrações de tiodicarbe padrão adicionadas (2,52, 3,30 e 4,05 mg L⁻¹). Os resultados apresentados na Tabela 8 mostram os valores de recuperação de 99,02 a 101,04%. Essas médias de recuperação demonstram a seletividade do método proposto e sugerem ausência de efeitos de matriz nessas determinações.

Tabela 8 – Recuperação do tiodicarbe em extratos de batata, maçã e morango usando o método proposto

Amostra	Tiodicarbe (mg L ⁻¹)		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado	
Batata	2,52	2,53	100,5
	3,30	3,29	99,9
	4,05	4,04	99,9
Maçã	2,52	2,54	100,7
	3,30	3,28	99,6
	4,05	4,04	99,8
Morango	2,52	2,55	101,0
	3,30	3,31	100,2
	4,05	4,01	99,02

O desempenho do biossensor proposto foi avaliado na determinação de tiodicarbe nas amostras descritas acima. A análise foi realizada usando o método de adição de padrão, em triplicata, e os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos usando o método HPLC (J. AOAC, 2002) (Tabela 9). De acordo com o teste *t* de Student, em um nível de confiança de 95 %, não há diferença significativa entre os resultados obtidos com o método oficial e o biossensor proposto. Assim, pode-se concluir que é adequado para esta aplicação.

Tabela 9 – Determinação de tiodicarbe (mg L^{-1}) em amostras de extratos de batata, maçã e morango usando o método oficial e o biossensor proposto

Amostras	Método oficial	Biossensor ^a	Erro relativo (%) ^b
Batata	$0,83 \pm 0,10$	$0,80 \pm 0,20$	+3,36
Maçã	$1,60 \pm 0,10$	$1,61 \pm 0,40$	-0,72
Morango	$2,43 \pm 0,10$	$2,41 \pm 0,20$	+0,66

^an=3, nível de confiança de 95%; ^b biossensor vs método oficial.

CAPÍTULO 3 SENSOR CONTENDO COMPLEXO DE NI(II) E MONOCAMADA AUTO-ORGANIZADA DE ÁCIDO 3-MERCPTOPROPIONICO PARA DETERMINAÇÃO DE CATEQUINA

4.1 RESUMO

Neste trabalho, um complexo de níquel (II) foi imobilizado sobre SAM de ácido 3-mercaptopropiônico em eletrodo de ouro para a determinação de catequina por voltametria de onda quadrada. O complexo de níquel utilizado foi o $[Ni^{II}L]$ com $L=[N-(\text{metil})-N'-(2\text{-piridilmetil})-N,N'\text{-bis}(3,5\text{-di-terc-butil-2-hidroxibenzil})-1,3\text{-propanodiamina [níquel (II)]}$. As condições otimizadas obtidas para este eletrodo modificado foram; solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0); frequência de 80 Hz; amplitude de pulso de 60 mV e incremento de 10 mV. Nestas condições, a corrente de pico resultante dos voltamogramas de onda quadrada aumenta linearmente com a concentração de catequina no intervalo de $3,31 \times 10^{-6}$ a $2,53 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com limite de detecção de $8,26 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e limite de quantificação de $2,75 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O desvio padrão relativo para uma solução contendo catequina $1,61 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foi de 2,45% para oito medidas sucessivas. O tempo de vida do eletrodo Au-SAM-complexo de Ni(II) foi investigado durante quatro semanas. Os resultados demonstram uma perda aparente de sua atividade após 20 dias. Os resultados obtidos para catequina em chá verde utilizando o biossensor proposto e aqueles obtidos pelo método de eletroforese capilar estão de acordo em um nível de confiança de 95 %.

4.2 INTRODUÇÃO

A catálise enzimática existente na natureza tem inspirado pesquisadores na síntese de moléculas mais simples, mas que possuam estruturas capazes de realizar catálises de espécies importantes. Dentre os compostos usados para a síntese dessas moléculas funcionais, estão os complexos de metais de transição que permitem a catálise de substratos através de reações redox (SOTOMAYOR e KUBOTA, 2002). Consequentemente, além dos eletrodos modificados com SAM e materiais biológicos reportados, muitos trabalhos foram realizados utilizando diferentes complexos metálicos para a determinação de diversos analitos. Complexos de metalofalocianinas apresentam propriedade redox muito interessante e por isso tem sido extensivamente utilizados em sensores eletroquímicos (OZOEMENA *et al.*, 2002; AGBOOLA *et al.*, 2007; MATEMADOMBO *et al.*, 2007; OZOEMENA *et al.*, 2007; OZOEMENA *et al.*, 2008). Esses complexos foram utilizados para modificar eletrodos usando a técnica da automontagem, devido às inúmeras vantagens associadas as SAM, que vão desde a simplicidade da produção até a obtenção de uma adequada sensibilidade e baixo limite de detecção (AGBOOLA *et al.*, 2008). Em adição, complexos possuem vantagens em relação ao uso de enzimas naturais, pois apresentam alta estabilidade em relação a fatores como pH e temperatura, e consequentemente, eles podem oferecer um tempo de vida maior e um grande número de determinações (JAROSZ-WILKOTAZKA *et al.*, 2004; ROY *et al.*, 2005).

Vários complexos miméticos também foram preparados para produzir um sistema capaz de imitar a catálise enzimática e usados na construção de sensores biomiméticos (WOLLENBERGER *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2007; CAO VILLA *et al.*, 2008; SOTOMAYOR *et al.*, 2008; SANTHIAGO *et al.*, 2008). Caovilla e colaboradores, 2008, estudaram a oxidação catalítica do limoneno, α -pineno e β -pineno pelo complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BPMP})\text{Cl}(\text{MO})]\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cl}_3$, um complexo biomimético para a enzima metano monooxigenase. Em estudo descrito por Sotomayor *et al.*, 2008, um complexo tetrapiridinoporfirazina de ferro foi utilizado como catalisador biomimético da enzima P450 e aplicado na construção de um sensor para determinação de paracetamol em fármacos. Wollenberger e co-autores, 1998, desenvolveram um sensor baseado na combinação de um eletrodo de peroxidase “screen-printed” e um complexo de ferro porfirina [ferro(III)-meso-tetrakis-(penta-fluorofenil)- β -tetrasulfonatoporfirina cloreto] para hidrocarbonetos alifáticos. Santhiago *et al.*, 2008, construíram um sensor biomimético

baseado em um complexo heterodinuclear $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ que mimetiza o sítio ativo da enzima hidrolítica fosfatase ácida púrpura, encontrada no feijão vermelho, e empregado na determinação de ácido rosmarínico. Oliveira *et al.*, 2007, produziram um sensor biomimético com um complexo dinuclear de cobre (II) para determinação de hidroquinona em cosméticos.

Neste trabalho, um complexo de níquel (II) (Figura 34) foi usado como molécula funcional, apresentando atividade eletrocatalítica para compostos fenólicos, na construção de um sensor que foi utilizado na determinação de catequina em chá verde.

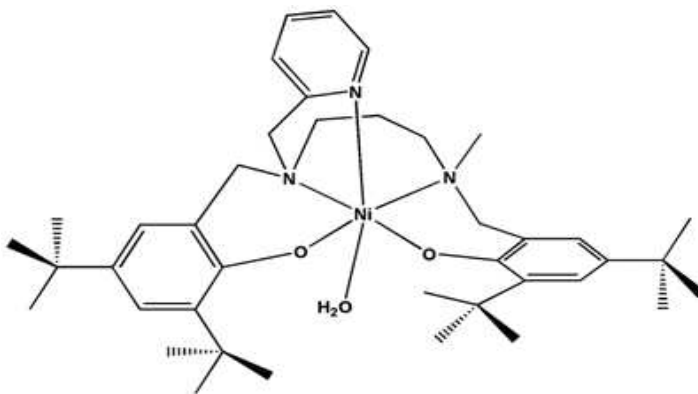


Figura 34 – Complexo Níquel II(L) com $\text{L}=[\text{N}-(\text{metil})-N'-(2\text{-piridilmetil})-N,N'\text{-bis}(3,5\text{-di-terc-butil-2-hidroxi-benzil})-1,3\text{-propanodia-mina}]$ [níquel (II)]

O chá verde, uma bebida de origem asiática, é produzido a partir da planta *Camellia sinensis*, pertencente à família Theaceae (LORENZI e MATOS, 2002). Este chá é uma das bebidas mais populares do mundo e seu consumo habitual foi associado com benefícios para a saúde. A medicina tradicional chinesa recomendou esta planta para prolongar a vida e para dores de cabeça, dores no corpo, distúrbios da digestão, depressão, desintoxicação e energizador. A maioria dos efeitos benéficos do chá verde é atribuída aos seus flavonóides polifenólicos, conhecidos como catequinas, e estes polifenóis são responsáveis por até 40% do peso seco do chá verde (GRAMZA-MICHALOWSKA *et al.*, 2007; CLEMENT, 2009).

O interesse na quantificação de catequinas está relacionado com seus potenciais benefícios na saúde humana. Dentre os vários efeitos

biológicos e farmacológicos estão sua ação como antioxidante, anticarcinogênico, antimutagênico, antiinflamatório e antimicrobiano. Estes compostos podem combater os radicais livres que danificam as células humanas sob condições de estresse oxidativo causando perturbações graves no metabolismo celular (MASUKAWA *et al.*, 2006; OZYURT *et al.*, 2007; EL-HADY e EL-MAALI, 2008). A Figura 35 mostra a fórmula estrutural da catequina.

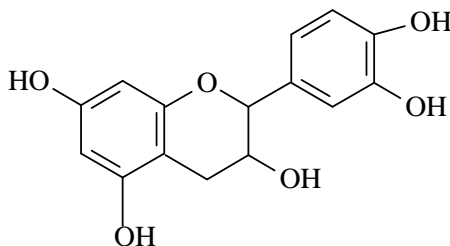


Figura 35 – Estrutura da catequina.

Vários métodos analíticos foram reportados na literatura para a determinação deste composto (DALLUGE e NELSON, 2000) sendo que os mais utilizados são baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (KHOKHAR *et al.*, 1997; LEE e ONG, 2000; WANG *et al.*, 2003; NISHITANI e SAGESAKA, 2004; MASUKAWA *et al.*, 2006) mas também foram propostos métodos baseados em espectrofotometria (OZYURT *et al.*, 2007), eletroforese capilar (ARCE *et al.*, 1998; TSUKAGOSHI *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008) e eletroquímica (JAROSZ-WILKOTAZKA *et al.*, 2004; ROY *et al.*, 2005; EL-HADY, 2007; EL-HADY e EL-MAALI, 2008; FERNANDES *et al.*, 2008). No trabalho de Fernandes *et al.*, 2008, foi usado um sensor contendo um complexo dinuclear de cobre II, que mimetiza uma catecol oxidase. Este sensor também foi usado para determinação de catequina em chá verde e apresentou uma faixa linear de concentração entre $4,95 \times 10^{-6}$ a $3,27 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com um limite de detecção de $2,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

4.3 PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1 Reagentes e Soluções

Ácido 3-mercaptopropiônico (AMP), diclorometano e catequina foram fornecidos pela Sigma. O complexo mononuclear de níquel (II) foi fornecido pelo Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC) – UFSC, onde foi sintetizado e caracterizado por Tiago Pacheco de Camargo sob a orientação do Prof. Dr. Ademir Neves. As amostras de chá verde foram adquiridas em um supermercado de Florianópolis.

As soluções de tampão fosfato (pH 6,0 a 9,0), a solução tampão acetato (pH 5,0), a solução de cianamida e a solução piranha foram preparadas conforme os métodos descritos para o preparo destas soluções no capítulo 2.

A solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de AMP foi preparada utilizando 870,0 µL deste composto em 10 mL de solução etanólica.

A solução $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ do complexo de níquel (II) foi preparada dissolvendo-se 9,3 mg do complexo em um balão volumétrico de 1,0 mL e completando-se o volume com diclorometano.

4.3.2 Instrumentação

A determinação de catequina pelo método comparativo foi realizada em um equipamento de eletroforese capilar da marca HP^{3D}CE Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA), equipado com um detector de arranjo de diodos. As medidas foram realizadas em 25°C em um capilar de sílica fundida sem revestimento (48,5 cm x 50 µm I.D. x 375 µm O.D. 40 cm de comprimento efetivo) obtido da Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). O software para aquisição dos dados foi o HP Chemstation®. Os demais instrumentos utilizados foram os descritos no capítulo 2. As medidas voltamétricas também foram realizadas conforme descrito no capítulo 2, sendo que neste estudo o eletrodo de trabalho foi o eletrodo de ouro modificado com o complexo de níquel (II).

4.3.3 Obtenção do Eletrodo Au-SAM-complexo de Ni(II)

Antes da modificação da superfície, o eletrodo de ouro foi submetido à limpeza mecânica, química e eletroquímica conforme o método descrito no capítulo 2 (Carvalho *et al.*, 2005). Após o tratamento de limpeza, a SAM foi formada pela imersão do eletrodo de ouro em uma solução etanólica $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de AMP por 1 h em temperatura ambiente. O eletrodo Au-SAM foi lavado com etanol para remover os tióis que não foram ligados e, em seguida, mergulhado em

solução contendo cianamida $0,36 \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato (pH 7,0) por um período de 1 h. Finalmente, uma alíquota de $15 \text{ }\mu\text{L}$ de solução $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de complexo de níquel (II) em diclorometano foi depositada sobre a superfície do eletrodo de ouro e seca à temperatura ambiente.

4.3.4 Preparação das Amostras de Chá Verde e Medidas Voltamétricas

Três amostras comerciais de chá verde (A = Bioslim, B = Leão e C = Chileno) foram preparadas pela extração de $2,0 \text{ g}$ de chá com 40 mL de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) em $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido por um período de incubação de 20 min com agitação por 2 min e filtragem. Uma alíquota de $100 \text{ }\mu\text{L}$ do extrato de chá verde foi transferida para uma cela eletroquímica contendo $15,0 \text{ mL}$ de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), seguida de sucessivas adições de solução padrão de catequina. Após cada adição da amostra ou solução padrão de catequina, e agitação por 60 s para a homogeneização, voltamogramas de onda quadrada foram obtidos aplicando um potencial de varredura entre $+0,4$ a $-0,1 \text{ V}$, com valores ideais de frequência, amplitude de pulso, e incremento de potencial de 80 mV , 60 Hz e 10 mV , respectivamente. Todas as medições foram realizadas em triplicata e as correntes foram medidas à temperatura ambiente vs Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

4.3.5 Método Comparativo

Eletroforese capilar foi usada para a determinação de catequina nas amostras de chá verde como método comparativo. As amostras foram diluídas 1:4:1 (v/v/v) amostra:água destilada:padrão interno (propilparabeno), antes da injeção. Para a quantificação, foi usada uma curva de calibração para concentrações de catequina entre 15 e 60 mg L^{-1} e uma concentração de padrão interno constante de 20 mg L^{-1} . Cada concentração foi preparada e injetada em triplicata. As soluções padrão e amostras foram injetadas hidrodinamicamente em 50 mbar por 3 s e a voltagem de separação aplicada foi 25 kV (polaridade negativa). O comprimento de onda do detector foi em 206 nm . O eletrólito usado foi uma mistura de dodecilsulfato de sódio e trietilamina em pH 2. Esta análise foi realizada pelo Laboratório de Eletroforese Capilar (LABEC – UFSC) do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Estudo dos Compostos Fenólicos

Inicialmente foi realizado um estudo para verificar a afinidade do complexo de níquel (II) para diferentes compostos fenólicos: ácido cafeico, carbidopa, catequina, hidroquinona e L-dopa. As respostas do sensor para estes substratos foram obtidas em uma concentração de $1,45 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0). A Figura 36 apresenta uma comparação das respostas obtidas, mostrando que o sensor proposto demonstrou diminuição da sensibilidade na seguinte ordem: catequina > hidroquinona > ácido cafeico > L-dopa > metildopa. Neste estudo, a catequina foi selecionada para a otimização do sensor.

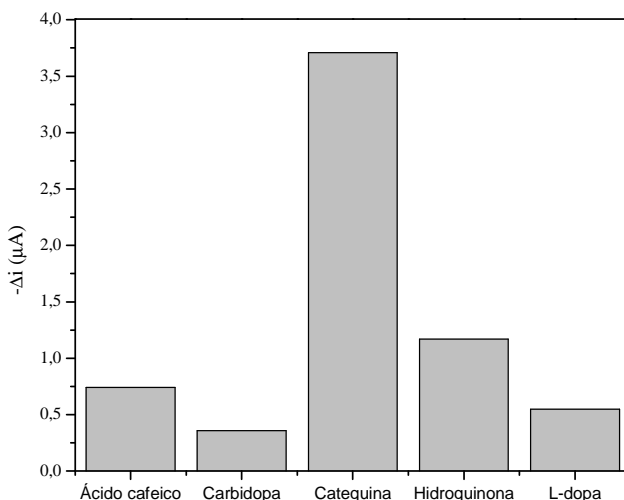


Figura 36 – Resposta do sensor para os compostos fenólicos investigados.

4.4.2 Formação do Eletrodo Au-SAM-complexo de Ni(II) e Comportamento Eletroquímico da Catequina

A Figura 37 mostra um esquema proposto para a imobilização do complexo de níquel (II) na superfície do eletrodo Au-SAM.

Inicialmente, a superfície do eletrodo de ouro foi modificada quimicamente com o ácido 3-mercaptopropiônico (a) para formar as camadas moleculares organizadas. Posteriormente, o eletrodo foi imerso em uma solução de cianamida (b), na qual as moléculas ligam-se aos grupamentos carboxila do tiol viabilizando a funcionalização com o grupamento amino e promovendo, em seguida, a automontagem coordenativa com o complexo funcional. O complexo de níquel (II) (c) foi então imobilizado através de uma ligação covalente coordenada sobre esta monocamada.

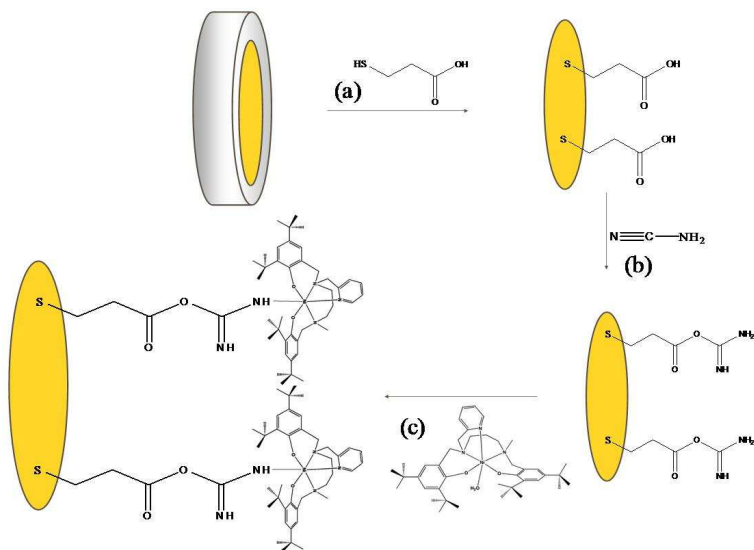


Figura 37 – Representação esquemática da imobilização do complexo de níquel (II) sobre o eletrodo Au-SAM.

Complexos de metal de transição como o níquel, são lábeis, trocando seu ligante rapidamente. Isto é resultado especialmente, dos efeitos cinéticos existentes bem como de efeitos termodinâmicos. Na interação com a cianamida, o complexo de níquel provavelmente coordena-se com o grupo amino para completar sua esfera de coordenação octaédrica, permitindo uma maior estabilidade do que se o

complexo fosse ligado a moléculas de água (SILVA e OLIVEIRA, 2006).

No complexo mononuclear de níquel (II) contendo o ligante pentadentado H_2L , os grupos fenolatos estão adequadamente protegidos por substituintes volumosos (*terc*-butil) nas posições *orto*- e *para*-, que através da oxidação eletroquímica geram um e dois elétrons das espécies fenoxil oxidadas em solução (SHIMAZAKI *et al.*, 2003; DOS ANJOS *et al.*, 2005). O complexo de níquel (II) catalisou a oxidação da catequina para sua respectiva quinona e, em seguida, a quinona produzida foi eletroquimicamente reduzida na superfície do sensor em um potencial de +0,18 V (Figura 38).

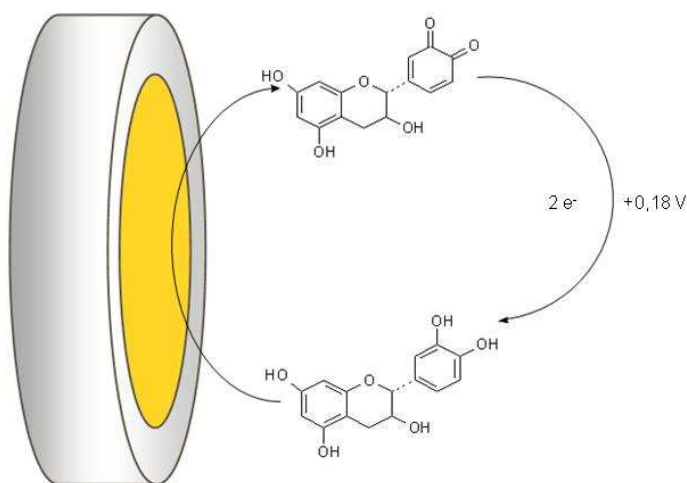


Figura 38 – Oxidação/redução da catequina sobre a superfície do sensor.

Para verificar o comportamento eletroquímico da catequina usando o sensor proposto foi realizada uma investigação por voltametria de onda quadrada em uma faixa de potencial de +0,6 a -0,3 V vs Ag/AgCl em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). A influência na resposta do sensor foi comparada com um eletrodo de ouro sem modificação. A Figura 39 mostra os voltamogramas obtidos usando os eletrodos: (a) eletrodo de ouro e (b) eletrodo Au-SAM-complexo de Ni(II) em solução de catequina 2,83x10⁻⁴ mol L⁻¹. Corrente maior de

resposta da quinona para catequina é fornecida pelo sensor proposto no potencial de +0,18 V quando comparada com a resposta do eletrodo de ouro, indicando claramente o papel do complexo na resposta do sensor. Este aumento na resposta do eletrodo modificado em relação ao eletrodo de ouro é uma característica atribuída à excelente imobilização do complexo e de sua atividade catalítica.

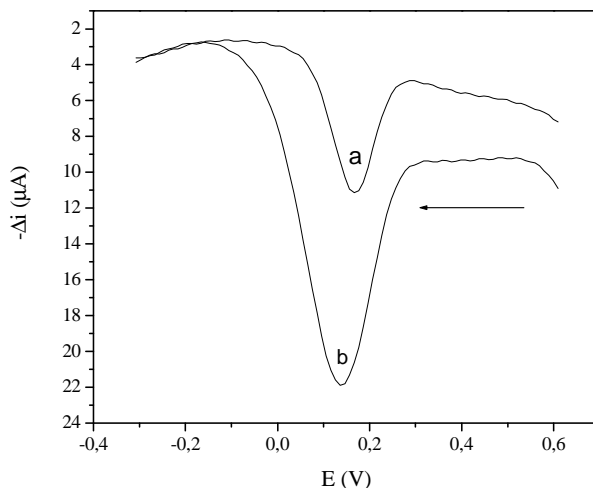


Figura 39 – Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de catequina $2,83 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0) para (a) eletrodo de ouro e (b) eletrodo Au-SAM-complexo de Ni(II).

4.4.3 Otimização dos Parâmetros Experimentais

O efeito do pH sobre a resposta do sensor proposto foi investigada sob a faixa de pH de 5,0 a 9,0 em solução tampão fosfato contendo uma concentração de catequina de $1,61 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A corrente catalítica aumentou até pH 7,0 e diminuiu gradualmente em valores de pH superiores (Figura 40). Portanto, esse valor de pH foi selecionado para os experimentos seguintes.

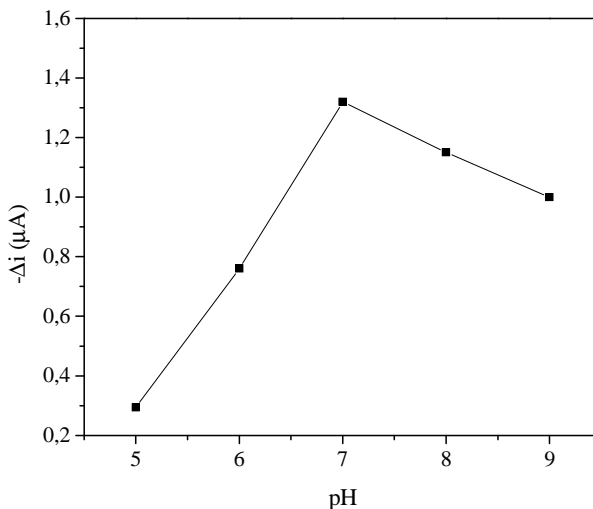


Figura 40 – Estudo de pH sobre a resposta do sensor.

Na otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada, os efeitos da frequência (10 a 100 Hz), amplitude de pulso (10 a 100 mV) e incremento (0,5 a 12 mV) foram estudados sobre a resposta do eletrodo Au-SAM-complexo de Ni(II) para uma solução $1,61 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de catequina.

A Figura 41 mostra que houve um crescimento linear da corrente de resposta do sensor para catequina até 80 Hz, permanecendo praticamente constante em frequências maiores, portanto este valor foi selecionado para os estudos subsequentes.

O efeito da variação da amplitude de pulso sobre a corrente de resposta do sensor foi também investigada. De acordo com os resultados mostrados na Figura 42, a corrente de resposta aumentou linearmente até 60 mV. Desta forma, a amplitude de 60 mV foi usada em todos os experimentos posteriores. Em adição, o parâmetro do incremento foi também estudado. Conforme mostra a Figura 43, houve um crescimento significativo da resposta até o valor de 10 mV, seguido de um decréscimo em valores maiores de incremento. Deste modo, o incremento de 10 mV foi selecionado para os próximos estudos.

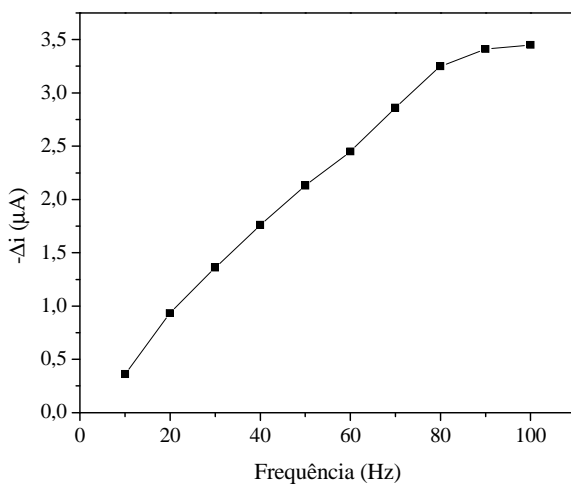


Figura 41 – Estudo de frequência sobre a resposta analítica do sensor.

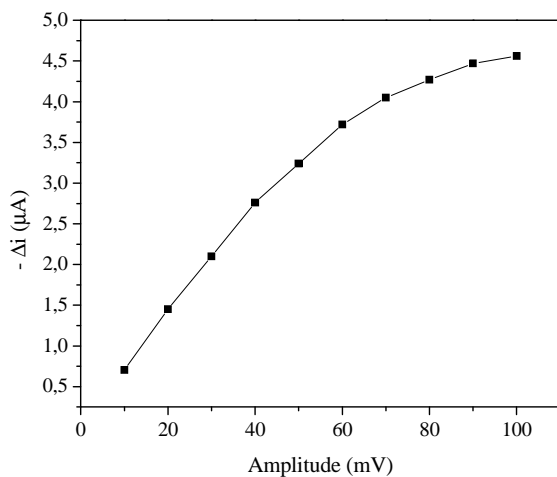


Figura 42 – Estudo da amplitude sobre a resposta analítica do sensor.

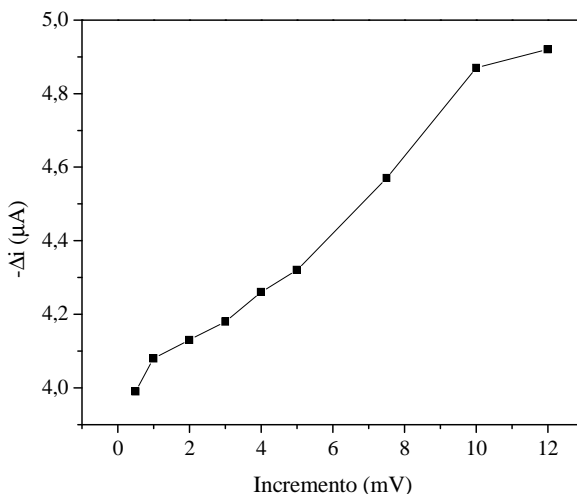


Figura 43 – Estudo do incremento sobre a resposta analítica do sensor

4.4.4 Repetibilidade, Reprodutibilidade e Estabilidade do Sensor

A repetibilidade do eletrodo Au-SAM-complexo de Ni(II) foi avaliada pela medida da corrente de resposta em uma solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0) contendo $1,61 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de catequina, realizando várias medidas separadas com o mesmo sensor. O desvio padrão relativo foi de 2,45 % para oito medidas sucessivas.

A reprodutibilidade foi também estudada e um desvio padrão relativo de 3,5 % foi obtido para três eletrodos independentes. O tempo de estabilidade do sensor foi investigado pela medida da corrente de resposta voltamétrica para uma solução de catequina $1,61 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato (pH 7,0) durante quatro semanas. Os resultados demonstraram perda aparente de sua atividade ($\geq 20 \%$) após 20 dias. A estabilidade do eletrodo Au-SAM-complexo de níquel (II) pode ser atribuída ao alto nível de organização e imobilização do complexo no eletrodo de ouro.

4.4.5 Curva Analítica, Recuperação e Determinação de Catequina

Sob as condições otimizadas descritas acima, a curva analítica obtida foi linear no intervalo de $3,31 \times 10^{-6}$ a $2,53 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de catequina e a equação da reta correspondente foi ($-\Delta i = 1,846 + 6,70 \times 10^5 [\text{catequina}]$; $r = 0,9987$), onde Δi é o pico da corrente resultante em μA , e $[\text{catequina}]$ a concentração de catequina em mol L⁻¹. A Figura 44 mostra os voltamogramas e a Figura 45 apresenta a curva analítica obtida. O limite de detecção foi de $8,26 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para catequina com o sensor proposto e o limite de quantificação foi de $2,75 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

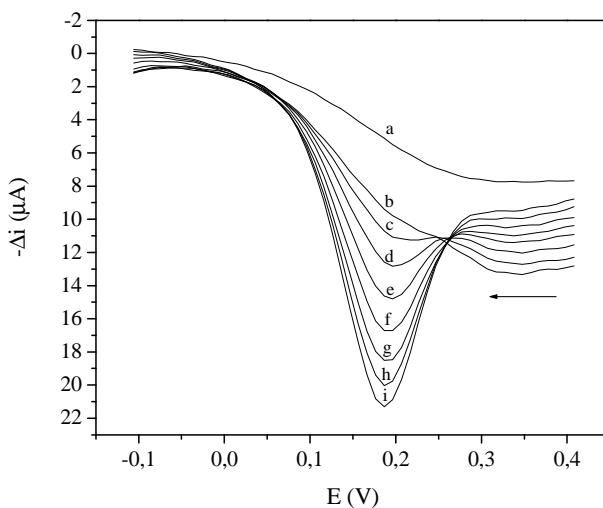


Figura 44 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o eletrodo Au-SAM-complexo de Ni(II) para: (a) solução tampão fosfato e soluções de catequina nas seguintes concentrações: (b) $3,31 \times 10^{-6}$; (c) $6,58 \times 10^{-6}$; (d) $9,80 \times 10^{-6}$; (e) $1,30 \times 10^{-5}$; (f) $1,61 \times 10^{-5}$; (g) $1,92 \times 10^{-5}$; (h) $2,23 \times 10^{-5}$; (i) $2,53 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em amplitude de pulso de 60 mV, frequência 80 Hz e incremento 10 mV.

Para os estudos de recuperação, soluções de catequina nas concentrações de 2,48, 4,64 e 7,26 mg L⁻¹ foram sucessivamente adicionadas para cada amostra analisada. Os resultados obtidos foram comparados com as concentrações adicionadas, encontrando-se uma faixa de recuperação de 98,2 a 105,0%, indicando uma ausência de

efeitos de matriz nas determinações de catequina usando o eletrodo Au-SAM-complexo de Ni(II).

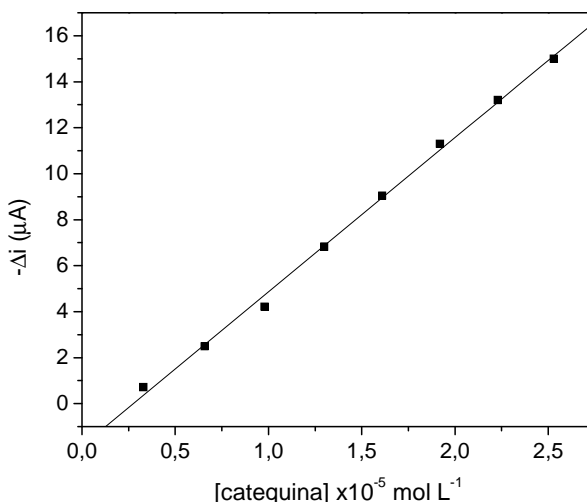


Figura 45 – Curva analítica para catequina.

Finalmente, as amostras de chá verde A, B e C, foram usadas para a determinação de catequina empregando o sensor proposto e os valores foram comparados com aqueles obtidos usando o método de eletroforese capilar. Os resultados encontrados para os dois métodos são mostrados na Tabela 10. Aplicado o teste *t*, esses resultados estão em concordância em um nível de 95%.

Tabela 10 – Determinação de catequina em chá verde usando o sensor proposto e o método de eletroforese capilar

Amostra	Catequina (mg L ⁻¹)		Erro relativo ^a (%)
	Eletroforese capilar ^b	Eletrodo Au-SAM-complexo de Ni(II) ^a	
A	159,1 ± 0,10	159,8 ± 0,20	-0,44
B	93,0 ± 0,10	90,6 ± 0,20	+2,58
C	88,2 ± 0,10	87,0 ± 0,10	+1,36

^a eletrodo Au-SAM-complexo de níquel (II) vs eletroforese capilar; nível de confiança de 95%, ^b n=4.

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos durante a execução deste trabalho, conclui-se que foi possível planejar e construir sensores sensíveis e estáveis à base de SAM. Os dispositivos propostos possibilitaram a realização da determinação da concentração de dopamina, tiodicarbe e catequina nas amostras de fármacos e alimentos testadas, demonstrando bom desempenho quando comparados aos resultados obtidos pelos métodos comparativos.

O primeiro biossensor desenvolvido neste trabalho, no qual empregou-se peroxidase obtida de fonte vegetal, foi utilizado para a determinação de dopamina em formulações farmacêuticas. A enzima proveniente do broto de feijão foi imobilizada com sucesso sobre o eletrodo de ouro modificado com monocamadas auto-organizadas oferecendo características analíticas favoráveis incluindo boa sensibilidade e faixa linear e aplicabilidade na determinação de dopamina. Em adição, os brotos de feijão são ricos em peroxidase e a enzima obtida deste material vegetal, oferece estabilidade, baixo custo e não requer cofator. Este eletrodo proposto combina a seletividade da enzima com a alta sensibilidade e estabilidade e tempo de resposta rápido comparado com outros procedimentos descritos na literatura para determinação de dopamina (KUMAR *et al.*, 2008, LI *et al.*, 2006, SHERVEDANI *et al.*, 2006, FERREIRA *et al.*, 2004).

O método proposto usando o eletrodo Au-SAM-broto de alfafa foi utilizado com sucesso na determinação seletiva de tiodicabe em batata, maçã e morango. Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos com este método e o método oficial e assim, pode-se concluir que o biossensor pode ser utilizado para a determinação de tiodicarbe sem efeitos da matriz para estas amostras. Este eletrodo também oferece as vantagens de uma boa linearidade, estabilidade, ausência de uma etapa de derivatização e tempo de resposta rápido.

Também foi construído um sensor no qual o complexo de níquel (II) foi imobilizado com sucesso sobre uma SAM do ácido 3-mercaptopropiônico em eletrodo de ouro. Este método de modificação de eletrodos foi interessante devido às vantagens que oferece: a facilidade da fabricação, a deposição reprodutível e a ligação covalente coordenada do complexo na superfície do eletrodo de ouro levando a uma maior estabilidade em relação a outros métodos de modificação. Este método também demonstra que moléculas sintéticas funcionais podem ser usadas como base no desenvolvimento de sensores para a

determinação de compostos de interesse. O sensor proposto foi usado para determinação de catequina, juntamente com eletroforese capilar. Como não há diferença significativa entre os resultados dos dois métodos, pode-se concluir que o eletrodo Au-SAM-complexo de Ni(II) pode ser usado para determinação de catequina sem sofrer com efeitos da matriz das amostras de chá verde. Este eletrodo modificado também oferece outras vantagens incluindo boa faixa linear e tempo de resposta rápido.

Além disso, destaca-se que estes eletrodos modificados com SAM seguem a tendência da “química limpa”, em razão de que utilizam menor quantidade de reagentes gerando pequeno volume de resíduos e assim diminuindo a poluição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBOOLA, B.; WESTBROEK, P.; OZOEMENA, K.I. E NYOKONG, T. Voltammetric characterisation of the self-assembled monolayers (SAMs) of benzyl- and dodecyl-mercapto tetra substituted metallophthalocyanines complexes. **Electrochem. Commun.**, 2007, 9, 310–316.

AGBOOLA, B.O. E OZOEMENA, K.I. Efficient Electrocatalytic Detection of Epinephrine at Gold Electrodes Modified with Self-Assembled Metallo-Octacarboxyphthalocyanine Complexes. **Electroanalysis**, 2008, 20, 1696 – 1707.

ALBUQUERQUE, Y.D.T. E FERREIRA, L.F. Amperometric biosensing of carbamate and organophosphate pesticides utilizing screen-printed tyrosinase-modified electrodes. **Anal. Chim. Acta**, 2007, 596, 210–221.

ALLARA, D.L. Critical issues in applications of self-assembled monolayers. **Biosens. Bioelectron.**, 1995, 10, 771-783.

ALPEEVA, I.S.; NICULESCU-NISTOR, M.; LEON, J.C.; CSÖREGI, E.; SAKHAROV, I.Y. Palm tree peroxidase-based biosensor with unique characteristics for hydrogen peroxide monitoring. **Biosens. Bioelectron.**, 2005, 21, 742–748.

ANDREESCU, S. E MARTY, J.-L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. **Biomol. Eng.**, 2006, 23, 1-15.

ARAKI, K. E TOMA, H.E. Química de sistemas supramoleculares constituídos por porfirinas e complexos metálicos. **Quim. Nova**, 2002, 25, 962-975.

ARCE, L.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system. **J. Chromatogr. A**, 1998, 827, 113-120.

ASAV, E.; YORGANCI, E.; AKYILMAZ, E. An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. **Talanta**, 2009, 78, 553-556.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L. E STRYER, L. **Biochemistry**. W. H. Freeman and Company, 5ª edição, New York, 2002.

BESOMBES, J-L.; COSNIER, S.; LABBE, P.; REVERDY, G. A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides. **Anal. Chim. Acta**, 1995, 311, 255-263.

BOGDANOVSKAYA, V.A. E TARASEVICH, M.R. Electrochemical biosensors for medicine and ecology. **Biosens. Bioelectron.**, 1996, 11, 853-861.

BOUBOUR, E. E LENNOX, R.B. Potential-induced defects in *n*-alkanethiol self-assembled monolayers monitored by impedance spectroscopy. **J. Phys. chem. B**, 2000, 104, 9004-9010.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. 3ª edição, Porto Alegre, Artmed Editora, 2000

CAMPUZANO, S.; SERRA, B.; PEDRERO, M.; VILLENA, J.M. E PINGARRÓN, J.M. Preparation, characterization and application of alkanethiol self-assembled monolayers modified with tetrathiofulvalene and glucose oxidase at a gold disk electrode. **J. Electroanal. Chem.**, 2002, 526, 92-100.

CAMPUZANO, S.; SERRA, B.; PEDRERO, M.; VILLENA, J.M. E PINGARRÓN, J.M. Amperometric flow-injection determination of phenolic compounds at self-assembled monolayer-based tyrosinase biosensors. **Anal. Chim. Acta.**, 2003, 494, 187–197.

CAOVILLA, M.; CAOVILLA, A.; PERGHER, S.B.C.; ESMELINDRO, M.C.; FERNANDES, C.; DARIVA, C.; BERNARDO-GUSMÃO, K.; OESTREICHER, E.G.; ANTUNES, O.A.C. Catalytic oxidation of limonene, α -pinene and β -pinene by the complex $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BPMP})\text{Cl}(\mu\text{-O})\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cl}_3]$ biomimetic to MMO enzyme. **Catal. Today**, 2008, 133, 695-698.

CARRERA, V.; SABATER, E.; VILANOVA, E.; SOGORB, M.A. A simple and rapid HPLC–MS method for the simultaneous determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine: application to the secretion of bovine chromaffin cell cultures, **J. Chromatogr. B**, 2007, 847, 88–94.

CARVALHAL, R.F.; FREIRE, R.S.; KUBOTA, L.T. Polycrystalline Gold Electrodes: A Comparative Study of Pretreatment Procedures Used for Cleaning and Thiol Self-Assembly Monolayer Formation. **Electroanalysis**, 2005, 17, 1251-1259.

CARVALHAL, R.F. Desenvolvimento de sensor biomimético empregando monocamadas auto-organizadas de tióis sobre eletrodos de ouro. Dissertação. Campinas, SP: [s.n], 2005.

CHAKI, N.K. E VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosens. Bioelectron.**, 2002, 17, 1-12.

CHEN, C D. E LI J. Interfacial design and functionization on metal electrodes through self-assembled monolayers, **Surf. Sci. Rep.**, 2006, 61, 445-463.

CHEN, Z.; ZHANG, L.; CHEN, G. Microwave-assisted extraction followed by capillary electrophoresis-amperometric detection for the determination of antioxidant constituents in *Folium Eriobotryae*. **J. Chromatogr. A**, 2008, 1193, 178-181.

CLEMENT, Y. Can green tea do that? A literature review of the clinical evidence. **Preventive Medicine**, 2009, 49, 83-87.

CODOGNATO, L.; WINTER, E.; PASCHOAL, J.A.R.; SUFFREDINI, H.B.; CABRAL, M.F.; MACHADO, S.A.S.; RATH, S. Electrochemical behavior of dopamine at a 3,3'- dithiodipropionic acid self-assembled monolayers. **Talanta**, 2007, 72, 427-433.

CONN, E.E. E STUMPF, P.K. **Introdução à bioquímica**, 4ª edição, São Paulo, Edgard Blücher, 1986.

CUŠ, F.; BAŠA, H.; ŠPELA, C.; BOLTA, V.; GREGORCIC, A. Pesticide residues and microbiological quality of bottled wines. **Food Control**, 2010, 21, 150-154.

CUSMÀ, A. CURULLI, A.; ZANE, D.; KACIULIS, S. PADELETTI, G. Feasibility of enzyme biosensors based on gold nanowires. **Mater. Sci. Eng. C**, 2007, 27, 1158-1161.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G. E SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quim. Nova**, 2004, 27, 623-630.

DALLUGE, J.J. E NELSON, B.C. Determination of tea catechins. **J. Chromatogr. A**, 2000, 881, 411-424.

DELVAUX, M. E DEMOUSTIER-CHAMPAGNE, S. Immobilisation of glucose oxidase within metallic nanotubes arrays for application to enzyme biosensors. **Biosens. Bioelectron.**, 2003, 18, 943- 951.

DONG, S. E LI, J. Self-assembled monolayers of thiols on gold electrodes for bioelectrochemistry and biosensors. **Bioelectrochem. Bioenerg.**, 1997, 42, 7-13.

DOS ANJOS, A.; BORTOLUZZI, A.J.; OSÓRIO, R.E.H.M.B.; PERALTA, R.A.; FRIEDERMANN, G.R.; MANGRICH, A.S.; NEVES, A. New mononuclear Cu^{II} and Zn^{II} complexes capable of stabilizing phenoxyl radicals as models for the active form of galactose oxidase. **Inorg. Chem. Commun.**, 2005, 8, 249-253.

DU, D.; HUANG, X.; CAI, J.; ZHANG, A.; DING, J.; CHEN, S. An amperometric acetylthiocholine sensor based on immobilization of acetylcholinesterase on a multiwall carbon nanotube-cross-linked chitosan composite. **Anal. Bioanal. Chem.**, 2007, 387, 1059–1065.

EBERSPACHER, T.A.; COLLMAN, J.P.; CHIDSEY, C.D.E.; DONOHUE, D.L.; RYSWYK, H.V. Modular Assembly and Air-Stable Electrochemistry of Ruthenium Porphyrin Monolayers. **Langmuir**, 2003, 19, 3814-3821.

EL-HADY, D.A. E EL-MAALI, N.A. Determination of catechin isomers in human plasma subsequent to green tea ingestion using chiral capillary electrophoresis with a high-sensitivity cell. **Talanta**, 2008, 76, 138-145.

EL-HADY, D.A. Selective and sensitive hydroxypropyl-beta-cyclodextrin based sensor for simple monitoring of (+)-catechin in some commercial drinks and biological fluids. **Anal. Chim. Acta**, 2007, 593, 178-187.

ENSAFI, A.A.; TAEI, M; KHAYAMIAN, T.; ARABZADEH, A. Highly selective determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid by differential pulse voltammetry using poly(sulfonazo III) modified glassy carbon electrode. **Sens. Actuators B**, 2010,147, 213–221.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3.ed. rev. e complementada conforme a Portaria M São Paulo (SP): Organização Andrei, 1977. 1213p.

FATIBELLO-FILHO, O. E CAPELATO, M.D. Biossensores. **Quim. Nova**, 1992, 15, 28-39.

FATIBELLO-FILHO, O. E VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Quim. Nova**, 2002, 25, 455-464.

FATIBELLO-FILHO, O. E VIEIRA, I. C. L-Ascorbic Acid Determination in Pharmaceutical Formulations Using a Biosensor Based on Carbon Paste Modified with Crude Extract of Zucchini (*Cucurbita pepo*). **J. Braz. Chem. Soc.**, 2000, 11, 412-418.

FATIBELLO-FILHO, O.; LUPETTI, K.O.; LEITE, O.D. E VIERIA, I.C. Electrochemical biosensors based on vegetable tissues and crude extracts for environmental, food and pharmaceutical analysis. Part 1- Fundamentals and applications. In: Salvador Alegret & Arben Merkoçi. (Org.). **Electrochemical sensor analysis**, 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 2007, 49, 355-375.

FELIX, F.S.; YAMASHITA, Y.; ANGNES, L. Epinephrine quantification in pharmaceutical formulations utilizing plant tissue biosensors. **Biosen. Bioelectron.**, 2006, 21, 2283-2289.

FERAPONTOVA, E.E.; GRIGORENKO, V.G. E EGOROV, A.M. P-chip and P-chip bienzyme electrodes based on recombinant forms of

horseradish peroxidase immobilized on gold electrodes. **Biochemistry**, 2001, 66, 832-839.

FERNANDES, S.C.; OLIVEIRA, I.R.W.Z.; VIEIRA, I.C. A green bean homogenate immobilized on chemically crosslinked chitin for determination of caffeic acid in white wine. **Enz. Microb. Technol.**, 2007, 40, 661-668.

FERNANDES, S.C.; OSÓRIO, R.E.H.M.B.; DOS ANJOS, A.; NEVES, A.; MICKE, G.A.; VIEIRA, I.C. Determination of Catechin in Green Tea using a Catechol Oxidase Biomimetic Sensor. **J. Braz. Chem. Soc.**, 2008, 19, 1215-1223.

FERNANDES, S.C.; VIEIRA, I.C.; PERALTA, R.A.; NEVES, A. Development of a biomimetic chitosan film-coated gold electrode for determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid. **Electrochim. Acta**, 2010, 55, 7152-7157.

FERREIRA, M.; DINELLI, L.R.; WOHNATH, K.; BATISTA, A.A.; OLIVEIRA JR. O.N. Langmuir-Blodgett films from polyaniline-ruthenium complexes as modified electrodes for detection of dopamine. **Thin Solid Films**, 2004, 446, 301-306.

FERREIRA, J.P.M. Segredos da catálise enzimática. Ensino em Biotecnologia - Boletim de Biotecnologia. <http://dequim.ist.utl.pt/bbio/72/pdf/cataliseenz.pdf>, 2008.

FERRETI, S.; PAYTNER, S.; RUSSELL, D.A.; SAPSFORD, K.E. E RICHARDSON, D.J. Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces. **Trends Anal. Chem.**, 2000, 19, 530-540.

FIORINI, M.; MCKENDRY, R.; COOPER, M.A.; RAYMENT, T. E ABELL, C. Chemical force microscopy with active enzymes. **Biophys. J.**, 2001, 80, 2471–2476.

FISCHER, L.M.; TENJE, M.; HEISKANEM, A.R.; MASUDA, N.; CASTILLO, J.; BENTTIEN, A.; ÉMNEUS, J.; JAKOBSEN, M.H.; BOISEN, A. Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. **Microelectronic Engineering**, 2009, 86, 1282–1285.

FREIRE, R.S.; PESSOA, C.A. E KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Quim. Nova**, 2003, 26, 381-389.

FURTADO, R.F.; DUTRA, R.A.F.; ALVES, C.R.; PIMENTA, M.G.R.P.; GUEDES, M.I.F. Aplicações de biossensores na análise de alimentos. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2008, 22p.

GASPAR, S.; POPESCU, I.C.; GAZARYAN, I.G.; BAUTISTA, A.G.; SAKHAROV, I.Y.; MATTIASSON, BO.; CSÖREGI, E. Biosensors based on novel plant peroxidases: a comparative study. **Electrochim. Acta**, 2000, 46, 255–264.

GOMES, F.M., DE PAULA, A.V., SILVA, G.S. E CASTRO, H.F. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Cândida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Quim. Nova**, 2006, 29, 710-718.

GOODING, J.J. E HIBBERT, D.B. The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrode. **Trends Anal. Chem.**, 1999, 18 525-533.

GOODING, J.J.; EROKHIN, P.; LOSIC, D.; YANG, W.; POLICARPIO, V.; LIU, J.; HO, F.M.; SITUMORANG, M.; HIBBERT, D.B. E SHAPTER, J.G. Parameters important in fabricating enzyme

electrodes using self-assembled monolayers of alkanethiols. **Anal. Sci.**, 2001, 17, 3-9.

GOTO, Y.; MATSUI, T.; OZAKI, S.-I.; WATANABE, Y.; FUKUZUMI, S. Mechanisms of sulfoxidation catalyzed by high-valent intermediates of heme enzymes: electron-transfer vs oxygen-transfer mechanism. **J. Am. Chem. Soc.**, 1999, 121, 9497-9502.

GRAMZA-MICHAŁOWSKA, A.; KORCZAK, J.; HÉS, M. Purification process influence on green tea extracts' polyphenol content and antioxidant activity. **Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.**, 2007, 6, 41-48.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J. E REIMHULT, E. Electrochemical biosensors – sensor principles and architectures. **Sensors**, 8, 2008, 1400-1458.

HAN, Y. E UOSAKI, K. Effects of concentration and temperature on the formation process of decanethiol self-assembled monolayer on Au(111) followed by electrochemical reductive desorption. **Electrochim. Acta**, 53, 2008, 6196–6201.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microb. Technol.**, 2006, 39, 235-251.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876 p.

HAYASHI, K.; HOZUMI, A.; SAITO, N.; SUGIMURA, H.; TAKAI, O. Selective immobilization of functional organic molecules onto a microtemplate fabricated using an amino-terminated self-assembled monolayer. **Surface Science**, 2003, 532–535 1072–1078.

HILDEBRANDT, A.; BRAGÓS, R.; LACORTE, S.; MARTY, J.L. Performance of a portable biosensor for the analysis of organophosphorus and carbamate insecticides in water and food. **Sens. Actuators B**, 2008, 133, 195–201.

HOIZEY, G.; CANAS, F.; BINET, L.; KALTENBACH, M.L.; JEUNEHOMME, G.; BERNARD, M.H.; LAMIABLE, D. Thiodicarb and methomyl tissue distribution in a fatal multiple compounds poisoning. **J. Forensic Sci.**, 2008, 53 499-502.

HU, G-Z.; ZHANG, D-P.; WU, W-L.; YANG, Z.S. Selective determination of dopamine in the presence of high concentration of ascorbic acid using nano-Au self-assembly glassy carbon electrode. **Coll. Surf. B: Biointerfaces**, 2008, 62, 199–205.

HUANGXIAN, J. E KANDIMALLA, V.B. IN: ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. (Eds.). *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*, Elsevier Book, Academic Press, 2008, p. 31.

J. AOAC Int. 17th, Method 997.14, AOAC, Gaithersburg, 2002.

JAROSZ-WILKOŁAZKA, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids. **Enzyme Microb. Technol.**, 2004, 35, 238-241.

JOSHI, P.; JOSHI, H.C.; SANGHI, S.K.; KUNDU, S. Immobilization of monoamine oxidase on eggshell membrane and its application in designing an amperometric biosensor for dopamine. **Microchim. Acta**, 2010, 169, 383–388.

KATO, D.; KUNITAKE, M.; NISHIZAWA, M.; MATSUE, T.; MIZUTANI, F. Amperometric nitric oxide microsensor using two-dimensional cross-linked Langmuir–Blodgett films of polysiloxane copolymer. **Sens. Actuators B**, 2005, 108, 384–388.

KEYHANI, J.; KEYHANI, T.E.; ZARCHIPOUR, S.; TAYEFI-NASRABADI, H.; EINOLLAHI, N. Stepwise binding of nickel to horseradish peroxidase and inhibition of the enzymatic activity. **Biochim. Biophys. Acta**, 2005, 1722, 312– 323.

KHOKHAR, S.; VENEMA, D.; HOLLMAN, P.C.H.; DEKKER, M.; JONGEN, W. A RP-HPLC method for the determination of tea catechins. **Cancer Lett.**, 1997, 114, 171-172.

KONG, D-S.; YU, Z-Y. E YUAN, S-L. The blocking and structural properties of a schiff base self-assembled monolayer on the surface of Au(111). **J Solid State Electrochem.**, 2005, 9, 174–180.

KOZAN, J.V.B.; SILVA, R.P.; SERRANO, S.H.P.; LIMA, A.W.O.; ANGNES, L. Biosensing hydrogen peroxide utilizing carbon paste electrodes containing peroxidases naturally immobilized on coconut (*Cocos nucifera* L.) fibers. **Anal. Chim. Acta**, 2007, 591, 200-207.

KRALJ, M.B.; TREBSE, P.; FRANKO, M. Applications of bioanalytical techniques in evaluating advanced oxidation processes in pesticide degradation. **Trends Anal. Chem.**, 2007, 26, 1020-1031.

KUMAR, S.A.; TANG, C.F. CHEN, S.M. Electroanalytical determination of acetaminophen using nano-TiO₂/polymer coated electrode in the presence of dopamine. **Talanta**, 2008, 76, 997-1005.

LEE, B.L. E ONG, C.-N. Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, 2000, 881, 439-447.

LEITE, O.D.; LUPETTI, K.O.; FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I.C.; BARBOSA, A. DE M. Synergic effect studies of the bi-enzymatic

system laccase-peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines. **Talanta**, 2003, 59, 889-896.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo, Sarvier, 1986.

LI, H-P.; LI, J-H.; LI, G-C.; JEN, J-F. Simultaneous determination of airborne carbamates in workplace by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Talanta**, 2004, 63, 547–553.

LI, Y. E LIN, X. Simultaneous electroanalysis of dopamine, ascorbic acid and uric acid by poly (vinyl alcohol) covalently modified glassy carbon electrode. **Sens. Actuators B**, 2006, 115, 134–139.

LIN, X.; KANG, G.; LU, L. DNA/Poly(p-aminobenzenesulfonic acid) composite bi-layer modified glassy carbon electrode for determination of dopamine and uric acid under coexistence of ascorbic acid. **Bioelectrochemistry**, 2007, 70, 235–244.

LINDGREN, A., GORTON, L.; RUZGAS, T.; BAMINGER, U.; HALTRICH, D. E SCHÜLEIN, M. Direct electron transfer of cellobiose dehydrogenase from various biological origins at gold and graphite electrodes. **J. Electroanal. Chem.**, 2001, 496, 76–81.

LIU, T.; LI, M. E LI, Q. Electroanalysis of dopamine at a gold electrode modified with N-acetylcysteine self-assembled monolayer. **Talanta**, 2004, 63, 1053-1059.

LIU, C.; GUO, X.; CUI, H.; YUAN, R. An amperometric biosensor fabricated from electro-co-deposition of sodium alginate and horseradish peroxidase. **J. Molecul. Catal. B: Enzymatic**, 2009, 60, 151–156.

LORENZI, H. E. MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas, 1st ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, São Paulo, 2002, p. 512.

LOVE, J.C.; ESTROFF, L.A.; KRIEBEL, J.K.; NUZZO, R.G. WHITESIDES, G.M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chem. Rev.**, 2005, 105, 1103-1169.

LOWINSOHN, D. BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Quim. Nova**, 2006, 29, 1318-1325.

LUPETTI, K.O.; RAMOS, L.A.; VIEIRA, I.C.; FATIBELLO-FILHO, O. A zucchini-peroxidase biosensor applied to dopamine determination. **Il Farmaco**, 2005, 60, 179-183.

MACIEL, H.P.F.; GOUVÊA, C.M.C.P.; TOYAMA, M.; SMOLKA, M.; MARANGONI, S. E PASTORE, G.M. Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves. **Quim. Nova**, 2007, 30, 1067-1071.

MANJUNATHA, R.; SURESH, G.S.; MELO, J.S.; D'SOUZA, S.F.; VENKATESHA, T.V. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using polystyrene sulfonate wrapped multiwalled carbon nanotubes bound to graphite electrode through layer-by-layer technique. **Sens. Actuators B**, 2010, 145, 643-650.

MARQUES, P.R.B.O. E YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Quim. Nova**, 2008, 31, 1791-1799.

MASUKAWA, Y.; MATSUI, Y.; SHIMIZU, N.; KONDOU, N.; ENDOU, H.; KUZUKAWA, M.; HASE, T. Determination of green tea

catechins in human plasma using liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, 2006, 834, 26–34.

MATEMADOMBO, F. E NYOKONG, T. Characterization of self-assembled monolayers of iron and cobalt octaalkylthiosubstituted phthalocyanines and their use in nitrite electrocatalytic oxidation. **Electrochim. Acta**, 2007, 52, 6856–6864.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb. Technol.**, 2007, 40, 1451–1463.

MATHIYARASU, J.; SENTHILKUMAR, S.; PHANI, K.L.N.; YEGNARAMAN, V. PEDOT–Au nanocomposite films for electrochemical sensing of dopamine and uric acid. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, 2007, 7, 2206–2210.

MAZZEI, F.; BOTRÈ, F.; FAVERO, G. Peroxidase based biosensors for the selective determination of D,L-lactic acid and L-malic acid in wines. **Microchem. J.**, 2007, 87, 81–86.

MELLO, L.D.; SOTOMAYOR, M.DELP.T.; KUBOTA, L.T. HRP-based amperometric biosensor for the polyphenolsdetermination in vegetables extract. **Sens. Actuators B: Chem.**, 2003, 96, 636–645.

MENDES, R.K.; FREIRE, R.S.; FONSECA, C.P.; NEVES, S.; KUBOTA, L.T. Characterization of self-assembled thiols monolayers on gold surface by electrochemical impedance spectroscopy. **J. Braz. Chem. Soc.**, 2004, 15, 849–855.

MICKOVA, B.; KOVALCZUK, T.; RAUCH, P.; MORENO, M.J.; ABAD, A.; MONTOYA, A.; FERRI, E.; FINI, F.; GIROTTI, S. Analytical performances of validated chemiluminescent enzyme immunoassays to detect *N*-methylcarbamate pesticides. **Anal. Chim. Acta**, 2005, 528, 243–248.

MORAES, F.C.; MASCARO, L.H.; MACHADO, S.A.S.; BRETT, C.M.A. Direct electrochemical determination of carbaryl using a multi-walled carbon nanotube/cobalt phthalocyanine modified electrode. **Talanta**, 2009, 79, 1406–1411.

NAGARAJA, P.; SRINIVASA MURTHY, K.C.; RANGAPPA, K.S.; MADE GOWDA, N.M. Spectrophotometric methods for the determination of certain catecholamine derivatives in pharmaceutical preparations. **Talanta**, 1998, 46, 39–44.

NAGARAJA, P.; VASANTHA, R.A.; SUNITHA, K.R. A sensitive and selective spectrophotometric estimation of catechol derivatives in pharmaceutical preparations. **Talanta**, 2001, 55, 1039–1046.

NAKAMURA, T.; AOKI, K. E CHEN, J.Y. Temperature-variation of capacitance of alkanethiol monolayer films. **Electrochim. Acta**, 2002, 47, 2407–2411.

NASCIMENTO, V.B. E ANGNES, L. Eletrodos fabricados por “silk-screens”. **Quim. Nova**, 1998, 21, 614–62

NEVES, A.; ANJOS, A.; BORTOLUZZI, A.J., SZPOGANICZ, B.; SCHWINGEL, E.W.; MANGRICH, A.S. Copper(II) complexes with {N,N',N,N'-bis[(2-hydroxybenzyl) (2-pyridylmethyl)]-1,3-propanediamine}* H₂bppn: their suitability as models for the inactive form of galactose oxidase. **Inorganica Chim. Acta**, 2003, 356, 41– 50.

NISHITANI, E. E SAGESAKA, Y.M. Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. **J. Food Compos. Anal.**, 2004, 17, 675–685.

NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGHB, M.; TAHERI, A. Preparation of silver hexacyanoferrate nanoparticles and its application

for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Talanta**, 2010, 80, 1657–1664.

NOVAK, M.A. New unsymmetric dinuclear Cu^{II}Cu^{II} complexes and their relevance to copper(II) containing metalloenzymes and DNA cleavage. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2006, 100, 992–1004.

NUNES, G.S.; BARCELÓ, D.; GRABARIC, B.S.; DIAZ-CRUZ, J.M.; RIBEIRO, M.L. Evaluation of a highly sensitive amperometric biosensor with low cholinesterase charge immobilized on a chemically modified carbon paste electrode for trace determination of carbamates in fruit, vegetable and water samples. **Anal. Chim. Acta**, 1999, 399, 37–49.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC International. 17th ed. Gaithersburg: AOAC International; 2002.

OLIVEIRA, I.R.W.Z. E VIEIRA, I.C. Immobilization procedues for the development o a biosensor for determination of hydroquinone using chitosan and gilo (*solanum gilo*). **Enzyme Microbial. Technol.**, 2006, 38, 449-456.

OLIVEIRA, I.R.W.Z.; OSÓRIO, R.E.H.M.B.; NEVES, A.; VIEIRA, I.C. Biomimetic sensor based on a novel copper complex for the determination of hydroquinone in cosmetics. **Sens. Actuators B**, 2007, 122, 89-94.

OLIVEIRA, I.R.W.Z.; NEVES, A.; VIEIRA, I.C. Development of a new biomimetic sensor based on an Fe^{III}Fe^{II} complex for the determination of phenolic compounds. **Sens. Actuators B**, 2008, 129, 424-430.

OZOEMENA, K.; WESTBROEK, P.; NYOKONG, T. Cyclic voltammetric studies of octabutylthiophthalocyaninato-cobalt(II) and its

self-assembled monolayer (SAM) on gold electrode. **J. Porphyrins Phthalocyanines**, 2002, 6, 98-106.

OZOEMENA, K.I.; NYOKONG, T.; NKOSI, D.; CHAMBRIER, I.; COOK, M.J. Insights into the surface and redox properties of single-walled carbon nanotube—cobalt(II) tetra-aminophthalocyanine self-assembled on gold electrode. **Electrochim. Acta**, 2007, 52, 4132-4143.

OZOEMENA, K. I.; NKOSI, D.; PILLAY, J. Influence of solution pH on the electron transport of the self-assembled nanoarrays of single-walled carbon nanotube-cobalt tetra-aminophthalocyanine on gold electrodes: Electrocatalytic detection of epinephrine. **Electrochim. Acta**, 2008, 53, 2844-2851.

OZYURT, D.; DEMIRATA, B.; APAK, R. Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce(IV) reducing capacity measurement. **Talanta**, 2007, 71, 1155-1165.

PITA, M.T.P.; REVIEJO, A.J.; DE VILLENA, F.J.M., PINGARRÓN, J.M. Amperometric selective biosensing of dimethyl- and diethyldithiocarbamates based on inhibition processes in a medium of reversed micelles. **Anal. Chim. Acta**, 1997, 340, 89-97.

PEDROSA, V.A.; CAETANO, J.; MACHADO, S.A.S.; BERTOTTI, M. Determination of Parathion and Carbaryl Pesticides in Water and Food Samples Using a Self Assembled Monolayer /Acetylcholinesterase Electrochemical Biosensor. **Sensors**, 2008, 8, 4600-4610.

PERALTA, R.A.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A.J.; ANJOS, A.; XAVIER, F.R.; SZPOGANICZ, B.; TERENCE, H.; OLIVEIRA, M.C.B.; CASTELLANO, E.; FRIEDERMANN, G.R.; MANGRICH, A.S. New unsymmetric dinuclear Cu^{II}Cu^{II} complexes and their relevance to copper(II) containing metalloenzymes and DNA cleavage. **J. Inorganic Biochem.**, 2006, 100, 992–1004.

PEREIRA, A.C.; SANTOS, A.S.; KUBOTA, L.T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Quim. Nova**, 2002, 25, 1012-1021.

PITA, M.T.P.; REVIEJO, A.J.; VILLENA, F.J.M. DE; PINGARRÓN, J.M. Amperometric selective biosensing of dimethyl- and diethyldithiocarbamates based on inhibition processes in a medium of reversed micelles. **Anal. Chim. Acta**, 1997, 340, 89-97.

RANG, H.P.; DALE, M.M. **Farmacologia**. 2ª ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 595p.

RAOOF, J.B.; OJANI, R.; NADIMI, S.R. Fabrication of a stable, switchable An/SAM-Au electrode with tunable electron transfer and excellent electrochemical properties. **Electrochim. Acta.**, 2008, 53, 7261–7265.

RAZOLA, S.S.; RUIZ, B.L.; DIEZ, N.M.; MARK JR, H.B.; KAUFFMANN, J-M. Hydrogen peroxide sensitive amperometric biosensor based on horseradish peroxidase entrapped in a polypyrrole electrode. **Biosens. Bioelectron.**, 2002, 17, 921-928.

REGALADO, C.; ALMENDÁREZ, B. C. G.; VÁZQUEZ, M. A. D. Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochem. Rev.**, 2004, 3, 243-256.

ROBERTS, C.; CHEN, C.S.; MRKSICH, M.; MARTICHONOK, V.; INGBER, D.E.; WHITESIDES, G.M. Using mixed self-assembled monolayers presenting RGD and (EG)3OH groups to characterize long-term attachment of bovine capillary endothelial cells to surfaces. **J. Am. Chem. Soc.**, 1998, 120, 6548-6555.

ROSSATO, S.S.; FREIRE, R.S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L.T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Quim. Nova**, 2001, 24, 77-86.

ROY, J.J.; ABRAHAM, T.E.; ABHIJITH, K.S.; KUMAR, P.V.S.; THAKUR, M.S. Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase. **Biosens. Bioelectron.**, 2005, 21, 206-211.

RUZGAS, T.; CSÖREGI, E.; EMNÉUS, J.; GORTON, L. E VARGA, G.M. Peroxidase-modified electrodes: fundamentals and application. **Anal. Chim. Acta**, 330, 1996, 123-138.

SANTHIAGO, M. E VIEIRA, I.C. L-Cysteine determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on laccase from *Aspergillus oryzae*. **Sens. Actuators B: Chem.**, 2007, 128, 279-285.

SANTHIAGO, M.; PERALTA, R.A.; NEVES, A.; MICKE, G.A.; VIEIRA, I.C. Rosmarinic acid determination using biomimetic sensor based on purple acid phosphatase mimetic. **Anal. Chim. Acta**, 2008, 613, 91-97.

SARIRI, R.; JAFARIAN, V.; SAJEDI, R.H.; KHAJEH, K. Inhibition of horseradish peroxidase by thiol type inhibitors: Mercaptoethanol and mercaptoacetic acid. **J. Mol. Liq.**, 2006, 128, 175-177.

SCHELLER, F.; SCHUBERT, F.; PFEIFFER, D.; HINTSCHE, R.; DRANSFELD, I.; RENNEBERG, R.; WOLLENBERG, U.; RIEDEL, K.; PAVLOVA, M.; KÜNH, M. E MÜLLER, H-G. Research and development of biosensors. **Analyst**, 1989, 114, 653-662.

SCHWARTZ, D.K. Mechanism and kinetics of self-assembled monolayer formation. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, 2001, 52, 107-137.

SEZGINTÜRK, M.K.; GÖKTUGW, T.; DINÇKAYA, E. Detection of Benzoic Acid by an Amperometric Inhibitor Biosensor Based on Mushroom Tissue Homogenate. **Food Technol. Biotechnol.**, 2005, 43, 329-334.

SHERVEDANI, R.K.; BAGHERZADEH, M.; MOZAFFARI, S.A. Determination of dopamine in the presence of high concentration of ascorbic acid by using gold cysteamine self-assembled monolayers as a nanosensor. **Sens. Actuators B**, 2006, 115, 614–621.

SHIMAZAKI, Y.; TANI, F.; FUKUI, K.; NARUTA, Y.; YAMAUCHI, O. One-Electron Oxidized Nickel(II)–(Disalicylidene)diamine Complex: Temperature-Dependent tautomerism between Ni(III)–Phenolate and Ni(II)–Phenoxy Radical States. **J. Am. Chem. Soc.**, 2003, 125, 10512-10513.

SHU, Z-Y.; JIANG, H.; LIN, R-F.; JIANG, Y-M.; LIN, L.; HUANG, J-Z. technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 2010, 62, 1-8.

SILVA, ADEMIR OLIVEIRA DA E OLIVEIRA, OTOM ALSELMO DA. Diversidade química do ambiente – Estabilidade e reações dos complexos de coordenação. – Natal, RN,: EDUFRN, 2006, 292 p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F.J. E NIEMAN, T.A. Princípios de análise instrumental, 5ª edição, Porto Alegre, Bookman, 2002.

SMITH, R.K.; LEWIS, P.A. E WEISS, P.S. Patterning self-assembled monolayers. **Prog. Surf. Sci.**, 2004, 75, 1-68.

SMULDERS, C.J.G.M.; BUETERS, T.J.H.;KLEEF, R.G.D.M. VAN; VIJVERBERG, H.P.M. Selective effects of carbamate pesticides on rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors and rat brain acetylcholinesterase. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 2003, 193, 139-146.

SMYTH, W.F. Voltammetric determination of molecules of biological significance. John Wiley & Sons Ltd., England, 1992.

SOTOMAYOR, M.D.P.T. E KUBOTA, L.T. Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. **Quim. Nova**, 2002, 25, 123-128.

SOTOMAYOR, M.D.P.T.; SIGOLI, A.; LANZA, M.R.V.; TANAKA, A.A.; KUBOTA, L.T. Construction and Application of an Electrochemical Sensor for Paracetamol Determination based on Iron Tetrpyridinoporphyrzine as a Biomimetic Catalyst of P450 Enzyme. **J. Braz. Chem. Soc.**, 2008, 19, 734-743.

SOUZA, M.F.B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Quim. Nova**, 1997, 20, 191-195.

SOUZA, D.; MACHADO, S.A.S. E AVACA, L.A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Quim. Nova**, 2003, 26, 81-89.

SU, X.; ZONG, Y.; RICHTER, R. E KNOLL, W. Enzyme immobilization on poly(ethylene-*co*-acrylic acid) films studied by quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. **J. Colloid Interface Sci.**, 2005, 287, 35-42.

SUR, U.K. E LACKSHMINARAYANAN, V. A study of the hydrophobic properties of alkanethiol self-assembled monolayers prepared in different solvents. **J. Electroanal. Chem.**, 2004, 565, 343-350.

TEMBE, S.; KUBAL, B.S.; KARVE, M.; D'SOUZA, S.F. Glutaraldehyde activated eggshell membrane for immobilization of tyrosinase from *Amorphophallus companulatus*: Application in

construction of electrochemical biosensor for dopamine. **Anal. Chim. Acta** 2008, 612, 212–217.

THÉVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R.A.; WILSON, G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosens. Bioelectron.**, 2001, 16, 121-131.

THIAGARAJAN, S. E CHEN, S.M. Preparation and characterization of PtAu hybrid film modified electrodes and their use in simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid. **Talanta**, 2007, 74, 212–222.

TINAZLI, A.; TANG, J.; VALIOKAS, R.; PICURIC, S.; LATA, S.; PIEHLER, J.; LIEDBERG, B. TAMP, R. High-Affinity Chelator Thiols for Switchable and Oriented Immobilization of Histidine-Tagged Proteins: A Generic Platform for Protein Chip Technologies. **Chem. Eur. J.**, 2005, 11, 5249 – 5259.

TLILI, C.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; MARTELET, M.; MAHY, J.P.; LECOMTE, S.; CHEHIMI, M.M. E KORRI-YOISSOUFI, H. A new method of immobilization of proteins on activated ester terminated alkanethiol monolayers towards the label free impedancemetric detection. **Mat. Sci. Eng. ,C**, 2008, 28, 861–868.

TSUKAGOSHI, K.; TANIGUCHI, T.; NAKAJIMA, R. Analysis of antioxidants using a capillary electrophoresis with chemiluminescence detection system. **Anal. Chim. Acta**, 2007, 589, 66-70.

ULIANA, C.V.; RICCARDI, C.S. E YAMANAKA, H. Estudo do comportamento eletroquímico da enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e ácido 5-aminossalicílico. **Ecl. Quim.**, 2008, 33, 57-62.

ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chem. Rev.**, 1996, 96, 1533-1554.

UMEZAWA, Y. E AOKI, H. Ion Channel Sensors Based on Artificial Receptors. **Anal. Chem.**, September 1, 2004.

VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, 2004, 65, 249-259.

VIEIRA, I.C. E FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using a crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*) as a source of peroxidase. **Analyst**, 1998, 123, 1809-1812.

VIEIRA, I.C.; FATIBELLO-FILHO, O.; ANGNES, L. Zucchini crude extract-palladium-modified carbon paste electrode for the determination of hydroquinone in photographic developers. **Anal. Chim. Acta**, 1999, 398, 145.

VIEIRA, I.C. E FATIBELLO-FILHO, O. L-Cysteine determination using a polyphenol oxidase-based inhibition flow injection procedure. **Anal. Chim. Acta**, 1999, 399, 287-293.

VIEIRA, I.C.; LUPETTI, K.O.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*). **Quim. Nova**, 2003, 26, 39-43.

WAN, C. E HARRINGTON, P. DE B. Screening GC-MS data for carbamate pesticides with temperature-constrained-cascade correlation neural networks. **Anal. Chim. Acta**, 2000, 408, 1-12.

WANG, J.; DEMPSEY, E.; EREMENKO, A.; SMYTH, M.R. Organic-phase biosensing of enzyme inhibitors. *Anal. Chim. Acta* 1993, 279, 203-208.

WANG, Q.; DONG, D.; LI, N. Electrochemical response of dopamine at a penicillamine self-assembled gold electrode. **Bioelectrochemistry**, 2001, 54, 169–175.

WANG, H.; PROVAN, G.J.; HELLIWELL, K. HPLC determination of catechins in tea leaves and tea extracts using relative response factors. **Food Chem.**, 2003, 81, 307-312.

WANG, P.; LI, Y.; HUANG, X.; WANG, L. Fabrication of layer-by-layer modified multilayer films containing choline and gold nanoparticles and its sensing application for electrochemical determination of dopamine and uric acid. **Talanta**, 2007, 73, 431–437.

WANG, S.; MU, H.; BAI, Y.; ZHANG, Y.; LIU, H. Multiresidue determination of fluoroquinolones, organophosphorus and *N*-methyl carbamates simultaneously in porcine tissue using MSPD and HPLC–DAD. **J. Chromatogr. B**, 2009, 877, 2961–2966.

WEI, D.; IVASKA, A. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors. **Anal. Chim. Acta**, 2008, 28, 126-135.

WEISSHAAR, D.E.; WALCZAC, M.M. E PORTER, M.D. Electrochemically induced transformations of monolayers formed by self-assembly of mercaptoethanol at gold. **Langmuir**, 1993, 9, 323-329.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochem.**, 2004, 65, 249-259.

WINK, T.; VAN ZUILEN, S. J.; BULT, A.; VAN BENNEKON, W. P. Tutorial review self-assembled monolayers for biosensors. **Analyst**, 1997, 122, 43R–50R.

WOLLENBERGER, U.; NEUMANN, B.; SCHELLER, .W. Development of a biomimetic alkane sensor. **Electrochim. Acta**, 1998, 43, 3581-3585.

YANG, Z.; GONZALEZ-CORTES, A.; JOURQUIN, G.; VIRÉ, J.C.; KAUFFMANN, J.M. Analytical application of self-assembled monolayers on gold electrodes: critical importance of surface pretreatment. **Biosens. Bioelectron.**, 1995, 10, 789-795.

YANG, Y.; YANG, M.; WANG, H.; JIANG, J.; SHEN, G.; YU, R. An amperometric horseradish peroxidase inhibition biosensor based on a cysteamine self-assembled monolayer for the determination of sulfides. **Sens. Actuators. B**, 2004, 102, 162–168.

YANG, Z.-S.; WU, W.-L.; CHEN, X.; LIU, Y.-C. An Amperometric Horseradish peroxidase inhibition biosensor for the determination of phenylhydrazine. **Anal. Sci.**, 2008, 24, 895-899.

YOSHITAKE, M.; NOHTA, H.; OGATA, S.; TODOROKI, K.; YOSHIDA, H.; YOSHITAKE, T. E YAMAGUCHI, M. Liquid chromatography method for detecting native fluorescent bioamines in urine using post-column derivatization and intramolecular FRET detection. **J. Chromatogr. B**, 2007, 858, 307–312.

YU, D.; BLANKERT, B.; KAUFFMANN, J.-M. Development of amperometric horseradish peroxidase based biosensors for clozapine and for the screening of thiol compounds. **Biosens. Bioelectron.**, 2007, 22, 2707–2711.

YUN, D.-H.; SONG, M.-J.; HON, S.-I.; KANG, M.K. E MIN, N.-K. Highly sensitive and renewable amperometric urea sensor based on self-assembled monolayer using porous silicon substrate. **J. Korean Phys. Soc.**, 2005, 47, S445-S449.

ZAGAL, J.H.; GRIVEAUB, S.; SILVA, J.F.; NYOKONG, T.; BEDIQUI, F. Metallophthalocyanine-based molecular materials as catalysts for electrochemical reactions. **Coordination Chemistry Reviews**, 2010, 254, 2755-2791.

ZATÓN, A.M.L. DE ASPURU, E.O. Horseradish peroxidase inhibition by thiouracils. **FEBS Lett.**, 1995, 374, 192-194.

ZEN, J-M. E CHEN, P-J. A Selective Voltammetric Method for Uric Acid and Dopamine Detection Using Clay-Modified Electrodes. **Anal. Chem.**, 1997, 69, 5087-5093.

ZHANG, M.; GONG, K.; ZHANG, H.; MAO, LAO. Layer-by-layer assembled carbon nanotubes for selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid. **Biosens. Bioelectron.**, 2005, 20, 1270–1276.

ZHANG, R.; JIN, G-D.; CHEN, D.; HU, X-Y. Simultaneous electrochemical determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid using poly (acid chrome blue K) modified glassy carbon electrode. **Sens. Actuators B**, 2009, 138, 174–181.

ZUCOLOTTO, V.; FERREIRA, M.; CORDEIRO, M.R.; CONSTANTINO, C.J.L.; MOREIRA, W.C.; OLIVEIRA JR., O.N. Nanoscale processing of polyaniline and phthalocyanines for sensing applications. **Sens. Actuators B**, 2006, 113, 809–815.